

Europäisches  
Patentamt

European Patent  
Office

PCT/EP2004/008623

Office européen  
des brevets

20/11/2004

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(e) OR (b)



REC'D 02 DEC 2004  
WIPO PCT

## Bescheinigung

## Certificate

## Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den  
The Hague,  
La Haye, le

06.10.2004

Der Präsident des Europäischen Patentamts  
Im Auftrag  
For the President of the European Patent Office  
Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

  
Mirella DELEYE

Patentanmeldung Nr.  
Patent application no.  
Demande de brevet n°

PCT/EP 03/09106

**Blatt 2 der Bescheinigung  
Sheet 2 of the certificate  
Page 2 de l'attestation**



Anmeldung Nr.:  
Application no.:  
Demande n°:

PCT/EP 03/09106

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):

1. SUNGENE GMBH & CO. KGAA - Gatersleben, Deutschland
2. SAUER, Matt - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
3. FLACHMAN, Ralf - Quedlinburg, Deutschland (nur US)

Bezeichnung der Erfindung:  
Title of the invention:  
Titre de l'invention:

Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch veränderten Organismen

18. August 2003 (18.08.2003)

Anmeldetag:  
Date of filing:  
Date de dépôt:

Anspruch genommene Priorität(en)  
Priority(ies) claimed  
Priorité(s) revendiquée(s)

Land:  
Country:  
Pays:

Tag:  
Date: 13. November 2002  
Date: (13.11.2002)

Aktenzeichen: 10253112.9  
File no.  
Numéro de dépôt:

Benennung von Vertragsstaaten : Siehe Formblatt PCT/RO/101 (beigefügt)  
Designation of contracting states : See Form PCT/RO/101 (enclosed)  
Désignation d'états contractants : Voir Formulaire PCT/RO/101 (ci-joint)

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:

Weitere Anmelder:

4. KLEBSATTEL, Martin - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
5. SCHOPFER, Christel Renate - Quedlinburg, Deutschland (nur US)

Weitere Prioritätsansprüche:

Deutschland

16. Dezember 2002  
(16.12.2002)

10258971.2

**Weitere Prioritätsansprüche:**

Deutschland	<b>20. August 2002 (20.08.2002)</b>	<b>10238980.2</b>
Deutschland	<b>20. August 2002 (20.08.2002)</b>	<b>10238978.0</b>
Deutschland	<b>20. August 2002 (20.08.2002)</b>	<b>10238979.9</b>

## PCT-ANTRAG

0000054058

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 06.08.2003 11:04:47 AM

V	Bestimmung von Staaten	
V-1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	<p>AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und Vertragsstaat des PCT ist</p> <p>EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist</p> <p>EP: AT BE BG CH&amp;LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist</p> <p>OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat des PCT ist</p>
V-2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	<p>AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&amp;LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW</p>
V-5	Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen Zusätzlich zu den unter Punkten V-1, V-2 and V-3 vorgenommenen Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der nachstehend unter Punkt V-6 angegebenen Staaten. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt.	
V-6	Staaten, die von der Erklärung über vorsorgliche Bestimmungen ausgenommen werden	KEINE
VI-1	Priorität einer früheren nationalen Anmeldung beansprucht	
VI-1-1	Anmeldedatum	
VI-1-2	Nummer	13 November 2002 (13.11.2002)
VI-1-3	Staat	10253112.9 DE

## Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch veränderten Organismen

### Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Organismen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

10 Carotinoide werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert. Ketocarotinoide, also Carotinoide, die mindestens eine Keto-Gruppe enthalten, wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin sind natürliche Antioxidantien und  
15 Pigmente, die von einigen Algen und Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert werden.

Aufgrund ihrer fargebenden Eigenschaften werden die Ketocarotinoide und insbesondere Astaxanthin als Pigmentierhilfsstoffe in der Tierernährung, insbesondere in der  
20 Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.

Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliche Ketocarotinoide, wie beispielsweise natürliches Astaxanthin, werden heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fermentation von  
25 gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

Ein wirtschaftliches biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Ketocarotinoiden ist daher von großer Bedeutung.  
30

Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Proteinsequenzen sind aus verschiedenen Organismen isoliert und annotiert worden, wie beispielsweise Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase aus *Agrobacterium aurantiacum* (EP 735 137, Accession NO: D58420), aus *Alcaligenes* sp. PC-1 (EP 735137, Accession NO: D58422), *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille und *Haematococcus pluvialis*, NIES-

144 (EP 725137, WO 98/18910 und Lo<sup>tan</sup> et al, FEBS Letters 1995, 364, 125-128,  
Accession NO: X86782 und D45881), *Paracoccus marcusii* (Accession NO: Y15112),  
*Synechocystis sp. Strain PC6803* (Accession NO: NP\_442491), *Bradyrhizobium sp.*  
(Accession NO: AF218415) und *Nostoc sp. PCC 7120* (Kaneko et al, DNA Res. 2001,  
5 8(5), 205 - 213; Accession NO: AP003592, BAB74888).

EP 735 137 beschreibt die Herstellung von Xanthophyllen in Mikroorganismen, wie  
beispielsweise *E. coli* durch Einbringen von Ketolase-Genen (crtW) aus *Agrobacterium*  
aurantiacum oder *Alcaligenes sp. PC-1* in Mikroorganismen.

10 Aus EP 725 137, WO 98/18910, Kajiwara et al. (Plant Mol. Biol. 1995, 29, 343-352)  
und Hirschberg et al.(FEBS Letters 1995, 364, 125-128) ist es bekannt, Astaxanthin  
durch Einbringen von Ketolase-Genen aus *Haematococcus pluvialis* (crtW, crtO oder  
bkt) in *E. coli* herzustellen.

15 Hirschberg et al.(FEBS Letters 1997, 404, 129-134) beschreiben die Herstellung von  
Astaxanthin in *Synechococcus* durch Einbringen von Ketolase-Genen (crtO) aus *Haemato-*  
*coccus pluvialis*. Sandmann et al. (Photochemistry and Photobiology 2001, 73(5),  
551-55) beschreiben ein analoges Verfahren, das jedoch zur Herstellung von Cantha-  
20 xanthin f<sup>h</sup>rt und nur Spuren Astaxanthin liefert.

WO 98/18910 und Hirschberg et al. (Nature Biotechnology 2000, 18(8), 888-892) be-  
schreiben die Synthese von Ketocarotinoiden in Nektarien von Tabakbl<sup>t</sup>ten durch Ein-  
bringen des Ketolase-Gens aus *Haematococcus pluvialis* (crtO) in Tabak.

25 WO 01/20011 beschreibt ein DNA Konstrukt zur Produktion von Ketocarotinoiden, ins-  
besondere Astaxanthin, in Samen von *Ölsaatpflanzen* wie Raps, Sonnenblume, Soja-  
bohne und Senf unter Verwendung eines Samen-spezifischen Promoters und einer  
Ketolase aus *Haematococcus pluvialis*.

30 Alle im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoi-  
den und insbesondere die beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Astaxanthin  
weisen den Nachteil auf, daß die transgenen Organismen eine gro<sup>Be</sup>e Menge an hydro-  
xylierten Nebenprodukten, wie beispielsweise Zeaxanthin und Adonixanthin liefern.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere genetisch veränderte Organismen, die Ketocarotinoide herstellen, zur Verfügung zu stellen, die die vorstehend beschriebenen Nachteile des

- 5 Standes der Technik in geringerem Maße oder nicht mehr aufweisen.

Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden gefunden, indem man genetisch veränderte Organismen kultiviert, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen und die veränderte Ketolase-Aktivität

- 10 durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 15 Die erfindungsgemäßen Organismen wie beispielsweise Mikroorganismen oder Pflanzen sind vorzugsweise als Ausgangsorganismen natürlicherweise in der Lage, Carotinoide wie beispielsweise  $\beta$ -Carotin oder Zeaxanthin herzustellen, oder können durch genetische Veränderung, wie beispielsweise Umregulierung von Stoffwechselwegen oder Komplementierung in die Lage versetzt werden, Carotinoide wie beispielsweise  $\beta$ -Carotin oder Zeaxanthin herzustellen.

- 20 Einige Organismen sind als Ausgangs- oder Wildtyporganismen bereits in der Lage, Ketocarotinoidewie beispielsweise Astaxanthin oder Canthaxanthin herzustellen. Diese Organismen, wie beispielsweise *Haematococcus pluvialis*, *Paracoccus marcusii*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Bacillus circulans*, *Chlorococcum*, *Phaffia rhodozyma*, Adonisröschen, *Neochloris wimmeri*, *Protosiphon botryoides*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Chlorella zofingiensis*, *Ankistrodesmus braunii*, *Euglena sanguinea*, *Bacillus atrophaeus*, *Blakeslea* weisen bereits als Ausgangs- oder Wildtyporganismus eine Ketolase-Aktivität auf.

- 25 30 In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden daher als Ausgangsorganismen Organismen verwendet, die bereits als Wildtyp oder Ausgangsorganismus eine Ketolaseaktivität aufweisen. In dieser Ausführungsform bewirkt die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp oder Ausgangsorganismus.

Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

- 5
- Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

- Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das  
10 Protein Ketolase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

- Bei einer erhöhten Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase die umgesetzte Menge  
15  $\beta$ -Carotin bzw. die gebildete Menge Canthaxanthin erhöht.

- Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Ketolase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %,  
20 insbesondere mindestens 600 % der Ketolase-Aktivität des Wildtyps.

Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß der entsprechende Ausgangsorganismus verstanden.

- 25 Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Organismus" der Ausgangsorganismus (Wildtyp) oder ein erfindungsgemäßer, genetisch veränderter Organismus oder beides verstanden werden.

- Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen der Organismus oder der Wildtyp  
30 nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter "Wildtyp" für die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Ketocarotinoiden jeweils ein Referenzorganismus verstanden.

Dieser Referenzorganismus ist für Mikroorganismen, die bereits als Wildtyp eine Ketolase Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Haematococcus pluvialis*.

Dieser Referenzorganismus ist für Mikroorganismen, die als Wildtyp keine Ketolase

5 Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Blakeslea*.

Dieser Referenzorganismus ist für Pflanzen, die bereits als Wildtyp eine Ketolase-Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Adonis aestivalis*, *Adonis flammeus* oder *Adonis annuus*, besonders bevorzugt *Adonis aestivalis*.

10 Dieser Referenzorganismus ist für Pflanzen, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität in Blütenblätter aufweisen, vorzugsweise *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*.

15 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

20 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzen- oder Mikroorganismenmaterial erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen oder Mikroorganismus-Extrakten wird mit den Substraten β-Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Soyalecithin) und Detergens (Natriumcholat) bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den

25 Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

Die Erhöhung der Ketolase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Translations- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, gegenüber dem Wildtyp, beispielsweise durch Induzierung des Ketolase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in den Organismus.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, wird 35 erfindungsgemäß in dieser Ausführungsform auch die Manipulation der Expression der Organismen eigenen endogenen Ketolasen verstanden. Dies kann beispielsweise

durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Ketolase kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine veränderte oder vorzugsweise erhöhte Expressionsrate mindestens eines endogenen Ketolase Gens zur Folge hat, kann durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

5

Es ist wie vorstehend beschrieben möglich, die Expression mindestens einer endogenen Ketolase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstanzen erfolgen.

10

Des weiteren kann eine erhöhte Expression mindestens eines endogenen Ketolase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im Wildtyporganismus nicht vorkommendes oder modifiziertes Regulatorprotein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

15

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNABindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der  
25 Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, in die Organismen, wobei die Ketolasen die Aminosäuresequenz  
30 SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz enthalten, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

35 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Ketolase-Gen vor, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von die-

ser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 5 In dieser Ausführungsform weist der erfindungsgemäße genetisch veränderte Organismus dementsprechend mindestens eine exogene (=heterologe) Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, auf oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, auf, wobei die Ketolasen die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren  
10 abgeleitete Sequenz enthalten, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

15 D In einer anderen, bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden als Ausgangsorganismen Organismen verwendet, die als Wildtyp keine Ketolaseaktivität aufweisen.

20 In dieser bevorzugten Ausführungsform verursacht die genetische Veränderung die Ketolase-Aktivität in den Organismen. Der erfindungsgemäße genetisch veränderte Organismus weist somit in dieser bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum ge-  
netisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, transgen eine Ketolase zu exprimieren, enthaltend die Aminosäurese-  
quenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

25 D 30 35 In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, analog zu der vorstehend beschriebenen Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, in den Ausgangsorganismus.  
Dazu kann in beiden Ausführungsformen prinzipiell jede Nukleinsäuren, die eine Ketolase kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser

Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, verwendet werden.

- 5 Die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, führt im erfindungsgemäßen Verfahren überraschenderweise zu Ketocarotinoiden mit einer geringeren Menge an hydroxylierten Nebenprodukten als bei der Verwendung der im Stand der Technik verwendeten Ketolase-Gene.
- 10 Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

- Bei genetischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryotischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.
- 15

- Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, und die entsprechenden Ketolase, 20 enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, die im erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhaft verwendet werden können, sind beispielsweise Sequenzen aus

25  
25 *Nostoc sp. Strain PCC7120* (Accession NO: AP003592, BAB74888; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2),

30 *Nostoc punctiforme ATTC 29133*, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000195, Basenpaar 55,604 bis 55,392 (SEQ ID NO: 3); Protein: Acc.-No. ZP\_00111258 (SEQ ID NO: 4) (als putatives Protein annotiert) oder

*Nostoc punctiforme ATTC 29133*, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000196, Basenpaar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 5), Protein: (SEQ ID NO: 6) (nicht annotiert),

*Synechococcus sp. WH 8102*, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABD01000001, Basenpaar 1,354,725-1,355,528 (SEQ ID NO: 46), Protein: Acc.-No. ZP\_00115639 (SEQ ID NO: 47) (als putatives Protein annotiert),

- 5 Nodularia spumigena NSOR10, (Accession NO: AY210783, AAO64399; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 52, Protein: SEQ ID NO: 53)

oder von diesen Sequenzen abgeleitete Ketolasesequenzen wie beispielsweise

- 10 die Ketolasen der Sequenz SEQ ID NO: 8 oder 10 und die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO: 9, die beispielsweise durch Variation/Mutation aus der Sequenz SEQ ID NO: 4 bzw. SEQ ID NO: 3 hervorgehen,

- 15 die Ketolasen der Sequenz SEQ ID NO: 12 oder 14 und die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 11 oder SEQ ID NO: 13, die beispielsweise durch Variation/Mutation aus der Sequenz SEQ ID NO: 6 bzw. SEQ ID NO: 5 hervorgehen, oder

- 20 die Ketolasen der Sequenz SEQ ID NO: 49 oder 51 und die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 48 oder SEQ ID NO: 50, die beispielsweise durch Variation bzw. Mutation aus der Sequenz SEQ ID NO: 47 bzw. SEQ ID NO: 46 hervorgehen.

- 25 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 30 2 leicht auffinden.

- Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID NO: 1 aus verschiedenen Organismen, deren 35 genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrittes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 5 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrittes von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65°C angehoben werden.

Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrift sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

(i) 4X SSC bei 65°C, oder

(ii) 6X SSC bei 45°C, oder

(iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

(iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder

(v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA,  
50 % Formamid bei 42°C, oder

(vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder

5

(vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder

10 (viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder

15 (ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42° (moderate Bedingungen).

(2) Waschschrifte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel

15

(i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50°C, oder

(ii) 0.1X SSC bei 65°C, oder

20 (iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68°C, oder

(iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder

(v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42°C, oder

25

(vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein, die eine Ketolase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz

30 SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 65 %, vorzugsweise mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 75 %, bevorzugter mindestens 80 %, bevorzugter mindestens 85 %, bevorzugter mindestens 90 %, bevorzugter mindestens 95 %, besonders bevorzugt mindestens 98 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID  
35 NO: 2 aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz, die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution,

- 5 Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

- 10 Unter Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

15 Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

- 20 Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:	
Gap opening penalty	10
30 Gap extension penalty	10
Gap separation penalty range	8
Gap separation penalty	off
% identity for alignment delay	40
Residue specific gaps	off
35 Hydrophilic residue gap	off
Transition weighing	0

Pairwise alignment parameter:

FAST algorithm on

K-tuple size	1
Gap penalty	3
5 Window size	5
Number of best diagonals	5

- Unter einer Ketolase, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend eine Ketolase verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 42 % aufweist.

- Beispielsweise weist nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz die 15 Sequenz der Ketolase aus *Nostoc punctiforme ATTC 29133* (SEQ ID NO: 4) mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) eine Identität von 65% auf.

- Die Sequenz der zweiten Ketolase aus *Nostoc punctiforme ATTC 29133* (SEQ ID NO: 20 6) weist mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) beispielsweise eine Identität von 58% auf.

- Die Sequenz der Ketolase aus *Synechococcus sp. WH 8102* (SEQ ID NO: 47) weist mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) beispielsweise eine Identität von 44% auf.

- Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 30 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismus-spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Die "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 35 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1, in den Organismus ein.

Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebau-

- 5 steine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in  
10 Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Die Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) weist mit den Sequenzen der Ketolasen die in den Verfahren des Standes der Technik verwendet werden eine Identität von 39% (*Agrobacterium aurantiacum* (EP 735 137, Accession NO: D58420), 40% (*Alcaligenes sp. PC-1* (EP 735137, Accession NO: D58422) und 20 bis 21 % (*Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille und *Haematococcus pluvialis*, NIES-144 (EP 725137, WO 98/18910 und Lotan et al, FEBS Letters 1995, 364, 125-128, Accession NO: X86782 und D45881) auf.

- 20 In einer bevorzugten Ausführungsform werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich zur erhöhten Ketolase-Aktivität eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

- 25 Unter Hydroxylase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

- 30 Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge β-Carotin oder Canthaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

- 5 Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge β-Carotin oder Canthaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.
- 10 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.
- 15 Unter β-Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer β-Cyclase verstanden.

Unter einer β-Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen β-Ionon-Ring zu überführen.

- 20 Insbesondere wird unter einer β-Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, γ-Carotin in β-Carotin umzuwandeln.

- 25 Dementsprechend wird unter β-Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein β-Cyclase umgesetzte Menge γ-Carotin bzw. gebildete Menge β-Carotin verstanden.

- Bei einer erhöhten β-Cyclase –Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein β-Cyclase die umgesetzte 30 Menge an Lycopin bzw. γ-Carotin oder die gebildete Menge an γ-Carotin aus Lycopin bzw. die gebildete Menge an β-Carotin aus γ-Carotin erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der β-Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt min-

destens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Organismusextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie  $\beta$ -Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.); Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalyse, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Organismusextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

Die Bestimmung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die Aktivität der  $\beta$ -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Organismusextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromprotein von Paprika, NADP+, NADPH und ATP zugegeben.

Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der  $\beta$ -Cyclase –Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclae inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

- 5 Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 250  $\mu$ l Volumen durchgeführt. Der An-  
satz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Organis-  
musextrakt, 20 nM Lycopin, 250  $\mu$ g an chromoplastidärem Stomaprotein aus Paprika,  
0.2 mM NADP+, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in  
10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium  
10 gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zu-  
gabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reak-  
tionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

- 15 Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sand-  
mann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

- Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase–Aktivität kann durch ver-  
schiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regula-  
tionsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Ge-  
20 nexpression von Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und/oder von Nuklein-  
säuren, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp.

- 25 Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase,  
und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -  
Cyclase, gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen,  
beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens  
durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-  
Genkopien und/oder  $\beta$ -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer  
Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder mindestens einer Nukleinsäure,  
30 kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, in den Organismus.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase  
und/oder  $\beta$ -Cyclase, wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der  
Organismus eigenen endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder  $\beta$ -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

5

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

10

Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

15

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, in den Organismus.

25

Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes  $\beta$ -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine  $\beta$ -Cyclase kodiert, verwendet werden.

30

Bei genomischen Hydroxylase- bzw.  $\beta$ -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryotischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs, zu verwenden.

35

Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764); (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 15, Protein: SEQ ID NO: 16).

- 5 Ein Beispiel für ein  $\beta$ -Cyclase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase aus Tomate (Accession X86452). (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 17, Protein: SEQ ID NO: 18).

In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres

- 10 Hydroxylase-Gen und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gen vor.

● In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der genetisch veränderte Organismus beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder

- 15 mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, auf.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion

- 20 oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase
- 25 aufweisen.

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der

- 30 entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID. NO: 16 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 15 aus verschiedenen Organis-

men deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der

- 5 Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 16.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 10 Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend des Organismus- spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Dieser "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- 15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 15, in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform  
20 als β-Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäure- sequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit  
25 der Sequenz SEQ ID NO: 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer β-Cyclase aufweisen.

- Weitere Beispiele für β-Cyclasen und β-Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend  
30 beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entspre- chenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 18 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für β-Cyclasen und β-Cyclase-Gene lassen sich weiterhin beispiels-  
35 weise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 17 aus verschiedenen Organismen,

deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der  $\beta$ -

- 5 Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Cyclase der Sequenz SEQ. ID. NO: 18.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 10 Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend des Organismus- spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Dieser "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- 15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 17 in den Organismus ein.

- 20 Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder  $\beta$ -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamidit-methode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Kle- now-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klo- nierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

- 25 30 Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren genetisch veränderte Organismen mit folgende Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

Genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen und

- genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder  
5 verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte  
 $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Die Herstellung dieser genetisch veränderten Organismen kann, wie nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu  
10 zwei oder drei der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

- Unter Organismen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Organismen verstanden, die als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung und/oder Umregulierung der Stoffwechselwege in der Lage sind,  
15 Carotinoide, insbesondere  $\beta$ -Carotin und/oder Zeaxanthin und/oder Neoxanthin und/oder Violaxanthin und/oder Lutein herzustellen.

Weiter bevorzugte Organismen weisen als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen bereits eine Hydroxylase-Aktivität auf und sind somit als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen in  
20 der Lage, Zeaxanthin herzustellen.

Bevorzugte Organismen sind Pflanzen oder Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

- Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringsens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organismus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Escherichia*, die beispielsweise crt-Gene aus *Erwinia* enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*,  
30 *Paracoccus*, *Nostoc* oder Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*.

Bevorzugte Bakterien sind *Escherichia coli*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. PC-1, *Flavobacterium* sp. strain R1534,

das Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Paracoccus marcusii* oder *Paracoccus carotinifaciens*.

- Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* oder *Phaffia*. Besonders bevorzugte Hefen sind *Xanthophyllomyces dendrorhous* oder *Phaffia rhodzyma*.

- Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium* oder weitere in Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus puvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

- Weitere brauchbare Mikroorganismen und deren Herstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise aus der DE-A-199 16 140 bekannt, worauf hiermit Bezug genommen wird.
- Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

- Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcurbita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hibiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Maratia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*,

- Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia*, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Lycopersicon*, *Rosa*,
- 5 *Calendula*, *Physalis*, *Medicago*, *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Aster*, *Tulipa*, *Narcissus*, *Petunia*, *Geranium*, *Tropaeolum* oder *Adonis*.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Organismen ein Ernten der

10 Organismen und weiter bevorzugt zusätzlich ein Isolieren von Ketocarotinoiden aus den Organismen angeschlossen.

- Das Ernten der Organismen erfolgt in an sich bekannter Weise dem jeweiligen Organismus entsprechend. Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze oder
- 15 Pflanzenzellen, die durch Fermentation in flüssigen Nährmedien kultiviert werden, können beispielsweise durch Zentrifugieren, Dekantieren oder Filtrieren abgetrennt werden. Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.
- 20 Die Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen erfolgt bevorzugt in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20°C, wie z.B. 20°C bis 40 °C, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9. Bei genetisch veränderten Mikroorganismen erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z.B. TB- oder
- 25 LB- Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20 °C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren Promoters. Die Kultivierung wird nach Induktion der Ketolaseexpression in Gegenwart von Sauerstoff, z.B. 12 Stunden bis 3 Tage, fortgesetzt.
- 30 Die Isolierung der Ketocarotinoide aus der geernteten Biomasse erfolgt in an sich bekannte Weise, beispielsweise durch Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemische oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie.
- 35

Wie nachstehend erwähnt, können die Ketocarotinoide in den erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen vorzugsweise in verschiedenen Pflanzengeweben, wie beispielsweise Samen, Blätter, Früchte, Blüten, insbesondere in Blütenblättern spezifisch hergestellt werden.

5

Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den geernteten Blütenblättern erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie 10 Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den Blütenblättern erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.

15 Weitere Isolierverfahren von Ketocarotinoiden, insbesondere aus Blütenblättern, sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phytochemistry (1967) 6, 437-440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609-618) beschrieben.

20 Vorzugsweise sind die Ketocarotinoide ausgewählt aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

Ein besonders bevorzugtes Ketocarotinoid ist Astaxanthin.

25 Je nach verwendetem Organismus fallen die Ketocarotinoide in freier Form oder als Fettsäureester an.

In Blütenblättern von Pflanzen fallen die Ketocarotinide im erfindungsgemäßen Verfahren in Form ihrer Mono- oder Diester mit Fettsäuren an. Einige nachgewiesene Fettsäuren sind z.B. Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinäure, Ölsäure, Linolensäure, 30 und Laurinsäure (Kamata und Simpson (1987) Comp. Biochem. Physiol. Vol. 86B(3), 587-591).

35 Die Herstellung der Ketocarotinoide kann in der ganzen Pflanze oder in einer bevorzugten Ausführungsform spezifisch in Pflanzengeweben, die Chromoplasten enthalten, erfolgen. Bevorzugte Pflanzengewebe sind beispielsweise Wurzeln, Samen, Blätter,

Früchte, Blüten und insbesondere Nektarien und Blütenblätter, die auch Petalen bezeichnet werden.

- In einer besonderes bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens  
5 verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem blütenspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

- In einer weiteren, besonderes bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Früchten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem fruchtspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

- In einer weiteren, besonderes bevorzugten, Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Samen die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem samenspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

- Das Targeting in die Chromoplasten erfolgt durch ein funktionell verknüpftes plastidäres  
35 Transitpeptid.

- Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase anstelle von Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Ketolase, erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

- Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.
- 15 Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.
- 20 Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

- 25 Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

- 5 Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten, aber nicht darauf beschränkten Sequenzen, sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärkern wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus
- 10 (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

● Als Promotor der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

- 15 "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228), der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202), den Triose-Phosphat Translokator (TPT) Promotor aus *Arabidopsis thaliana* Acc.-No. AB006698 , Basenpaar 53242 bis 55281; das Gen beginnend ab bp 55282 ist mit "phosphate/triose-phosphate translocator" annotiert, oder den 34S Promoter aus Figwort mosaic virus Acc.-No. X16673, Basenpaar 1 bis 554.

- 30 Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), der Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc

Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), der Smas Promotor, der Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hillebrand et al. (1996), Gene, 170, 197-200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 10:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknos, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Mattton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

- Umfasst sind auch verwundungsinduzierbare Promotoren wie der des pinII-Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992) 5 Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 10 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß 10 entwicklungsabhängig erfolgt.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise 15 Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel, Samen und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 20 Patatin-Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

Blüten spezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen-Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593), der AP3 Promoter aus Arabidopsis thaliana (siehe Beispiel 5), der CHRC-Promoter (Chromoplast-specific carotenoid-associated protein (CHRC) gene promoter aus Cucumis sativus Acc.-No. AF099501, Basenpaar 1 bis 1532), der EPSP\_Synthase Promotor (5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene promoter aus Petunia hybrida, Acc.-No. M37029, Basenpaar 1 bis 1788), der PDS Promotor (Phytoene desaturase gene pro-

moter aus *Solanum lycopersicum*, Acc.-No. U46919, Basenpaar 1 bis 2078), der DFR-A Promotor (Dihydroflavonol 4-reductase gene A promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No. X79723, Basenpaar 32 bis 1902) oder der FBP1 Promotor (Floral Binding Protein 1 gene promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No. L10115, Basenpaar 52 bis 1069).

5

Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), der glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

Samen-spezifische Promotoren sind beispielsweise der ACP05-Promotor (Acyl-carrier-Protein Gen, WO9218634), die Promotoren AtS1 und AtS3 von *Arabidopsis* (WO 9920775), der LeB4-Promotor von *Vicia faba* (WO 9729200 und US 06403371), der Napin-Promotor von *Brassica napus* (US 5608152; EP 255378; US 5420034), der SBP-Promotor von *Vicia faba* (DE 9903432) oder die Maispromotoren End1 und End2 (WO 0011177).

15

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

20 Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive, samenspezifische, fruchtspezifische, blüten spezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blüten spezifischen oder insbesondere einen blütenblattspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

30

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promoters mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular

- Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987), beschrieben sind.

Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren, kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

- 10 Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase–Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase–Teil enzymatisch abgespalten werden.

- 15 Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent 20 abgeleitet ist.

Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

5 pTP09

- KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC  
GTTCTGTCCCTGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCTTCTCTCTC-  
30 CACTTTCCGGCCTAAATCCAATCCCATACTACCACCTCCGCCGCCG-  
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCGTAAGGTCACCGGC-  
GATTCTGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAATGAGACTGC GG-  
GATCC\_BamHI

35 pTP10

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC  
 GTTCTGTCCCTGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCTTCTCTCT-  
 CACTTTTCCGGCCTAAATCCAATCCAAATATCACCCACCTCCGCCGCG-  
 TACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTAAGGTACCCGGC-  
 5 GATTCTGTGCCTCAGCTGCAACCAGAAACCATAGAGAAAAACTGAGACTGCGCTG-  
 GATCC\_BamHI

pTP11

10 KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC  
 GTTCTGTCCCTGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCTTCTCTCT-  
 CACTTTTCCGGCCTAAATCCAATCCAAATATCACCCACCTCCGCCGCG-  
 TACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTAAGGTACCCGGC-  
 GATTCTGTGCCTCAGCTGCAACCAGAAACCATAGAGAAAAACTGAGACTGCGGG-  
 15 GATCC\_BamHI

Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabisopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. *Nucl. Acids Res.* 16: 11380).

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist.

Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptores oder Linker angesetzt werden.

- Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.
- Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).
- Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.
- Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

- Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-

Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation  
5 bezeichnet.

Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von  
Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen  
Transformation genutzt werden.

10 Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation  
● durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren  
mit der Genkanone – die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation,  
15 die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion  
und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die  
genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene  
Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von  
S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev.  
Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225) beschrieben.

20 Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3,  
● pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

25 Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

30 Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN5 und pSUN3 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu  
35 werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen ver-

wendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

- 5 Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw.  
Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein  
10 in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

- 20 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res.16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl  
25 in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Im folgenden wird die Herstellung der erfindungsgemäßen gentisch veränderten Mikroorganismen näher beschrieben:

- 30 Die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase oder  $\beta$ -Hydroxylase oder  $\beta$ -Cyclase sind vorzugsweise in Expressionskonstrukte eingebaut, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäßes Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer "operativen Ver-

- 5 knüpfung" versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

- 10 Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.

- 15 Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale 20 vor das Strukturen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

- 25 Beispiele für brauchbare Promotoren in Mikroorganismen sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trptet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, lambda-PR- oder im lambda-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2 oder die Hefepromotoren 30 ADC1, MFa , AC, P-60, CYC1, GAPDH. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P<sub>r</sub>P<sub>r</sub>-Promotor.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

- 5 Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.
- 10 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.
- 15

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Pro-  
motors mit den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine  
Ketolase,  $\beta$ -Hydroxylase oder  $\beta$ -Cyclase sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungs-  
signal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannte Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre

DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Als Beispiele für geeignete Expressionsvektoren können genannt werden:

- 5      Übliche Fusionsexpressionsvektoren, wie pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B.  
und Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA)  
und pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST),  
Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert  
0      wird.
- 15     Nicht-Fusionsprotein-Expressionsvektoren wie pTrc (Amann et al., (1988) Gene  
69:301-315) und pET 11d (Studier et al. Gene Expression Technology: Methods in  
Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89) oder pBluescript  
15     und pUC-Vektoren.

- 20     Hefe-Expressionsvektor zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae*, wie pYEpSec1 (Bal-  
dari et al., (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) Cél-  
lula 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen  
Corporation, San Diego, CA).

- 25     Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in  
anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend  
beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer  
systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics  
of Fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

- 30     Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen  
(bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) Mol.  
Cell Biol.. 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology  
170:31-39).

- 35     Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen  
sind in Kapitel 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., Molecular  
cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring  
Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskonstrukte bzw. Vektoren sind genetisch veränderte Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind.

- 5 Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebbracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren  
10 im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

- Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen,  
15 die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden.

- 20 Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

- 25 Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen λ oder andere temperante Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet  
30 ein Expressionssystem.

- Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen, dadurch gekennzeichnet, das man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen Promotor und Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine

Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, und gegebenenfalls einen Terminator in das Genom des Ausgangsorganismus oder extrachromosomal in den Ausgangsorganismus einführt.

- 5 Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Organismen, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase

A für den Fall, dass der Wildtyporganismus bereits eine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und

- 10 B für den Fall, dass der Wildtyporganismus keine Ketolase-Aktivitätaufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht

und die nach A erhöhte oder nach B verursachte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase  
15 verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 20 Wie vorstehend ausgeführt erfolgt die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp vorzugsweise durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von  
25 mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt, wie vorstehend ausgeführt, die Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in die Pflanzen und damit vorzugsweise durch Überexpression oder transgene Expression von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Organismus, enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. Dies ist der Fall, wenn der Ausgangsorganismus keine Ketolase oder eine endogen Ketolase aufweist und eine transgene Ketolase überexprimiert wird.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Organismus, enthaltend mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. Dies ist der Fall, wenn der Ausgangsorganismus eine endogen Ketolase aufweist und die endogene Ketolase überexprimiert wird.

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Organismen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität gegenüber einem Wildtyporganismus auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäß Verfahren beschrieben.

Unter Organismen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Organismen verstanden, die als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung und/oder Umregulierung der Stoffwechselwege in der Lage sind, Carotinoide, insbesondere  $\beta$ -Carotin und/oder Zeaxanthin und/oder Neoxanthin und/oder Violaxanthin und/oder Lutein herzustellen.

Weiter bevorzugte Organismen weisen als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen bereits eine Hydroxylase-Aktivität auf und sind somit als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen in der Lage, Zeaxanthin herzustellen.

Bevorzugte Organismen sind Pflanzen oder Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organis-

mus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Escherichia*, die beispielsweise crt-Gene aus *Erwinia* enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*,

- 5 *Paracoccus*, *Nostoc* oder Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*.

Bevorzugte Bakterien sind *Escherichia coli*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. PC-1, *Flavobacterium* sp. strain R1534, das Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Paracoccus marcusii* oder *Paracoccus carotinifaciens*.

- Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* oder *Phaffia*. Besonders bevorzugte Hefen sind *Xanthophyllomyces dendrorhous* oder *Phaffia rhodzyma*.

- 15 Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium* oder weitere in Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

- 20 Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus puvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

- 25 Weitere brauchbare Mikroorganismen und deren Herstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise aus der DE-A-199 16 140 bekannt, worauf hiermit Bezug genommen wird.

- Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amanthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

- 35 Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arni-*

- ca, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*,  
*Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcurbita*, *Cytisus*,  
*Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*,  
*Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Gre-*  
5 *villea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hibiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*,  
*Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lili-*  
*um*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Maratia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*,  
*Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*,  
10 *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*,  
● *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussi-*  
*lago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia*, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der  
Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Lycopersicon*, *Rosa*,  
Calendula, *Physalis*, *Medicago*, *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Aster*, *Tulipa*, *Narcissus*,  
Petunia, *Geranium*, *Tropaeolum* oder *Adonis*.
- 15 Ganz besonders bevorzugte genetisch veränderte Pflanzen sind ausgewählt aus den  
Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Adonis*, *Lycopersicon*;  
*Rosa*, *Calendula*, *Physalis*, *Medicago*, *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Aster*, *Tulipa*, *Nar-*  
*cissus*, *Petunia*, *Geranium* oder *Tropaeolum*, wobei die genetisch veränderte Pflanze  
20 mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthält.
- Die transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -  
gewebe oder -teile, insbesondere deren Früchte, Samen, Blüten und Blütenblätter  
sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.
- 25 Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstel-  
lung von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin verwendet werden.
- Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Or-  
30 ganismen, insbesondere Pflanzen oder Pflanzenteile, wie insbesondere Blütenblätter  
mit erhöhtem Gehalt an Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin können auch bei-  
spielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder  
Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden.

Ferner können die genetisch veränderten Organismen zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten der Organismen und/oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

- 5 Die genetisch veränderten Organismen weisen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden auf.

Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Ketocarotinoid verstanden.

- 10 Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird aber auch insbesondere ein veränderter Gehalt der bevorzugten Ketocarotinoide verstanden, ohne dass zwangsläufig der Gesamt-Carotinoidgehalt erhöht sein muss.

- 15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Astaxanthin auf.

- Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall auch ein verursachter Gehalt an Ketocarotinoiden, bzw. Astaxanthin verstanden.

Die Erfindung betrifft ferner die neuen Ketolasen sowie die neuen Nukleinsäuren, die diese kodieren.

- 25 Insbesondere betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Amino-  
30 säureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 4 nicht enthalten ist. Die Sequenz SEQ ID NO: 4 ist, wie vorstehend erwähnt, als putatives Protein in Datenbanken annotiert.

- Ferner betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Amino-

säureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 aufweist. Die Sequenz SEQ ID NO: 6 ist, wie vorstehend erwähnt, in Datenbanken nicht annotiert.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 12 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 12 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 6 nicht enthalten ist.

● Ferner betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 49 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 60%, besonders bevorzugt mindestens 70%, bevorzugter mindestens 80%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 49 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 47 nicht enthalten ist. Die Sequenz SEQ ID NO: 47 ist, wie vorstehend erwähnt, als putatives Protein in Datenbanken annotiert.

20 Die Erfindung betrifft ferner Nukleinsäuren, kodierend ein vorstehend beschriebenes Protein, mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure nicht die Sequenz SEQ ID NO: 5 enthält.

● 5 Überraschenderweise wurde gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens

80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

- 5 Ferner wurde überraschenderweise gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65%, vorzugsweise mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

- Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65%, vorzugsweise mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

- Ferner wurde überraschenderweise gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 47 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60 %, vorzugsweise mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 47 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

- 30 Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 47 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60 %, vorzugsweise mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter

mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 47 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

- Im Vergleich zu den Verfahren des Standes der Technik, liefert das erfindungsgemäße  
5 Verfahren eine höhere Menge an Ketocarotinoide, insbesondere Astaxanthin mit einer geringeren Menge an hydroxylierten Nebenprodukten.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

- 10 Allgemeine Experimentelle Bedingungen:  
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

- Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-  
15 DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

- Beispiel 1:  
Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NOST-Ketolase aus  
20 *Nostoc sp. PCC 7120* codiert

Die DNA, die für die NOST-Ketolase aus *Nostoc sp. PCC 7120* kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc sp. PCC 7120* (Stamm der "Pasteur Culture Collection of Cyanobacterium") amplifiziert.

- 25 Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc sp. PCC 7120*, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0.04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0.075 g/l MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1ml trace metal mix A5+Co (2.86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.39 g/l NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.079 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

Protokoll für DNA Isolation aus *Nostoc PCC7120*:

Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10minütige Zentrifugation bei 8 000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem

- 5 Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10mM Tris HCl (pH 7,5) resuspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000  
10 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C  
15 gelöst.

- Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc PCC 7120*, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc sp. PCC 7120* unter Verwendung eines  
sense-spezifischen Primers (NOSTF, SEQ ID No. 19) und eines antisense-  
20 spezifischen Primers (NOSTG SEQ ID No. 20) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der  
gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:  
85

- 1 ul einer *Nostoc sp. PCC 7120* DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NOSTF (SEQ ID No. 19)
- 0.2 mM NOSTG (SEQ ID No. 20)
- 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ul Aq. Dest.

30  
35

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten  
35X 94°C 1 Minute  
55°C 1 Minuten  
5 72°C 3 Minuten  
1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 19 und SEQ ID No. 20 resultierte in einem 805 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert 10 (SEQ ID No. 21). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert und der Klon pNOSTF-G erhalten.

Sequenzierung des Klons pNOSTF-G mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte 15 eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 88,886-89,662 des Datenbankeintrages AP003592 identisch ist. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigem Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc sp. PCC 7120*.

20 Dieser Klon pNOSTF-G wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 799 Bp SphI-Fragmentes aus pNOSTF-G und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Ketolase von *Nostoc* 25 *sp. PCC 7120* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJNOST.

#### Beispiel 2:

Konstruktion des Plasmides pMCL-CrtYIBZ/idi/gps für die Synthese von Zeaxanthin in *E. coli*

30 Die Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ/idi/gps erfolgte in drei Schritten über die Zwischenstufen pMCL-CrtYIBZ und pMCL-CrtYIBZ/idi. Als Vektor wurde das mit high-copy-number Vektoren kompatible Plasmid pMCL200 verwendet (Nakano, Y., Yoshida, Y., Yamashita, Y. und Koga, T.; Construction of a series of pACYC-derived plasmid 35 vectors; Gene 162 (1995), 157-158).

## Beispiel 2.1.: Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ

Die Biosynthesegene *crtY*, *crtB*, *crtI* und *crtZ* entstammen dem Bakterium *Erwinia uredovora* und wurden mittels PCR amplifiziert. Genomische DNA von *Erwinia uredovora* (DSM 30080) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) innerhalb eines Service-Dienstes präpariert. Die PCR-

5 Reaktion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt (Roche, Long Template PCR: Procedure for amplification of 5-20 kb targets with the expand long template PCR system). Die PCR-Bedingungen für die Amplifikation des Biosynthesecusters von *Erwinia uredovora* waren die folgenden:

10

## Master Mix 1:

●

- 1.75 µl dNTPs (Endkonzentration 350 µM)
  - 0.3 µM Primer Crt1 (SEQ ID No. 22)
  - 15 - 0.3 µM Primer Crt2 (SEQ ID No. 23)
  - 250 – 500 ng genomische DNA von DSM 30080
- Aq. Dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 50 µl

●

## Master Mix 2:

20

- 5 µl 10x PCR Puffer 1 (Endkonzentration 1x, mit 1.75 mM Mg<sup>2+</sup>)
- 10x PCR Puffer 2 (Endkonzentration 1x, mit 2.25 mM Mg<sup>2+</sup>)
- 10x PCR Puffer 3 (Endkonzentration 1x, mit 2.25 mM Mg<sup>2+</sup>)
- 0.75 µl Expand Long Template Enzyme Mix (Endkonzentration 2.6 Units)

●

5 Aq. Dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 50 µl

●

Die beiden Ansätze "Master Mix 1" und "Master Mix 2" wurden zusammenpipetiert. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

30

- 1X 94°C 2 Minuten
  - 30X 94°C 30 Sekunden
  - 58°C 1 Minute
  - 68°C 4 Minuten
- 35 1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 22 und SEQ ID No. 23 resultierte in einem Fragment (SEQ ID NO: 24), das für die Gene *CrtY* (Protein: SEQ ID NO: 25), *CrtI* (Protein: SEQ ID NO: 26), *crtB* (Protein: SEQ ID NO: 27) und *CrtZ* (*iDNA*) kodiert. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-

- 5 Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pCR2.1-CrtYIBZ erhalten.

Das Plasmid pCR2.1-CrtYIBZ wurde Sall und HindIII geschnitten, das resultierende Sall/HindIII-Fragment isoliert und durch Ligierung in den Sall/HindIII geschnittenen Vektor pMCL200 transferiert. Das in pMCL 200 klonierte Sall/HindIII Fragment aus 10 pCR2.1-CrtYIBZ ist 4624 Bp lang, kodiert für die Gene *CrtY*, *CrtI*, *crtB* und *CrtZ* und entspricht der Sequenz von Position 2295 bis 6918 in D90087 (SEQ ID No. 24). Der resultierende Klon heisst pMCL-CrtYIBZ.

- Beispiel 2.2.: Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ/idi  
15 Das Gen *idi* (Isopentenyldiphosphat-Isomerase; IPP-Isomerase) wurde aus *E. coli* mittels PCR amplifiziert. Die Nukleinsäure, kodierend das gesamte *idi* Gen mit *idi*-Promotor und Ribosomenbindestelle, wurde aus *E. coli* mittels "polymerase chain reaction" (PCR) unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (5'-*idi* SEQ ID No. 28) und eines antisense-spezifischen Primers (3'-*idi* SEQ ID No. 29) amplifiziert.

- 20 20 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 1 ul einer *E. coli* TOP10- Suspension  
- 0.25 mM dNTPs  
- 0.2 mM 5'-*idi* (SEQ ID No. 28)  
- 0.2 mM 3'-*idi* (SEQ ID No. 29)  
30 - 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)  
- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)  
- 28.8 ul Aq. Dest

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten  
20X 94°C 1 Minute  
62 °C 1 Minute  
72°C 1 Minute  
5 1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 28 und SEQ ID No. 29 resultierte in einem 679 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 30). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in 10 den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pCR2.1-idi erhalten.

Sequenzierung des Klons pCR2.1-idi bestätigte eine Sequenz, die sich nicht von der publizierten Sequenz AE000372 in Position 8774 bis Position 9440 unterscheidet. Diese Region umfaßt die Promotor-Region, die potentielle Ribosomenbindestelle und den gesamten "open reading frame" für die IPP-Isomerase. Das in pCR2.1-idi klonierte Fragment hat durch das Einfügen einer Xhol-Schnittstelle am 5'-Ende und einer Sall-Schnittstelle am 3'-Ende des *idi*-Gens eine Gesamtlänge von 679 Bp.

20 Dieser Klon wurde daher für die Klonierung des *idi*-Gens in den Vektor pMCL-CrtYIBZ verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des Xhol/Sall-Fragments aus pCR2.1-idi und Ligierung in den Xhol/Sall geschnittenen Vektor pMCL-CrtYIBZ. Der resultierende Klon heisst pMCL-CrtYIBZ/*idi*.

Beispiel 2.3.: Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ/*idi/gps*  
Das Gen *gps* (Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase; ; GGPP-Synthase) wurde aus *Archaeoglobus fulgidus* mittels PCR amplifiziert. Die Nukleinsäure, kodierend *gps* aus *Archaeoglobus fulgidus*, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (5'-*gps* SEQ ID No. 32) und eines anti-sense-spezifischen Primers (3'-*gps* SEQ ID No. 33) amplifiziert.

30 Die DNA von *Archaeoglobus fulgidus* wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) innerhalb eines Service-Dienstes präpariert. Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein GGPP-Synthase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 1 µl einer *Archaeoglobus fulgidus*-DNA
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM 5'-gps (SEQ ID No. 32)
- 0.2 mM 3'-gps (SEQ ID No. 33)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 10 - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 15 1X 94°C 2 Minuten
- 20X 94°C 1 Minute
- 56°C 1 Minute
- 72°C 1 Minute
- 1X 72°C 10 Minuten

20 Das mittels PCR und den Primern SEQ ID No. 32 und SEQ ID No. 33 amplifizierte DNA-Fragment wurde mit an sich bekannten Methoden aus dem Agarosegel eluiert und mit den Restriktionsenzymen Ncol und HindIII geschnitten. Daraus resultiert ein 962 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz 25 kodiert (SEQ ID No. 34). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Ncol/HindIII geschnittene Amplifikat in den Vektor pCB97-30 kloniert und der Klon pCB-gps erhalten.

Sequenzierung des Klons pCB-gps bestätigte eine Sequenz für die GGPP-Synthase 30 aus *A. fulgidus*, die sich von der publizierten Sequenz AF120272 in einem Nukleotid unterscheidet. Durch das Einfügen einer Ncol-Schnittstelle im gps-Gen wurde das zweite Kodon der GGPP-Synthase verändert. In der publizierten Sequenz AF120272 35 kodiert CTG (Position 4-6) für Leucin. Durch die Amplifikation mit den beiden Primern SEQ ID No. 32 und SEQ ID No. 33 wurde dieses zweite Kodon in GTG verändert, welches für Valin kodiert.

Der Klon pCB-gps wurde daher für die Klonierung des *gps*-Gens in den Vektor pMCL-CrtYIBZ/idi verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des KpnI/Xhol-Fragmentes aus pCB-gps und Ligierung in den KpnI und Xhol geschnittenen Vektor pMCL-CrtYIBZ/idi. Das klonierte KpnI/Xhol-Fragment (SEQ ID No. 34) trägt den Prrn16-Promotor zusammen mit einer minimalen 5'-UTR-Sequenz von *rbcL*, den ersten 6 Kodons von *rbcL*, die die GGPP-Synthase N-terminal verlängern, und 3' vom *gps*-Gen die *psbA*-Sequenz. Der N-Terminus der GGPP-Synthase hat somit anstelle der natürlichen Aminosäure-Abfolge mit Met-Leu-Lys-Glu (Aminosäure 1 bis 4 aus AF120272) die veränderte Aminosäure-Abfolge Met-Thr-Pro-Gln-Thr-Ala-Met-Val-Lys-Glu. Daraus resultiert, dass die rekombinante GGPP-Synthase, beginnend mit Lys in Position 3 (in AF120272) identisch ist und keine weiteren Änderungen in der Aminosäuresequenz aufweist. Die *rbcL*- und *psbA*-Sequenzen wurden gemäß einer Referenz nach Eibl et al. (Plant J. 19. (1999), 1-13) verwendet. Der resultierende Klon heisst pMCL-CrtYIBZ/idi/gps.

15

Beispiel 3:

Biotransformation von Zeaxanthin in rekombinanten *E. coli*-Stämmen

Zur Zeaxanthin-Biotransformation wurden rekombinante *E. coli*-Stämme hergestellt, welche durch heterologe Komplementation zur Zeaxanthin-Produktion befähigt sind. Stämme von *E. coli* TOP10 wurden als Wirtszellen für die Komplementations-Experimente mit den Plasmiden pNOSTF-G und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps verwendet.

Um *E. coli*-Stämme herzustellen, die die Synthese von Zeaxanthin in hoher Konzentration ermöglichen, wurde das Plasmid pMCL-CrtYIBZ/idi/gps konstruiert. Das Plasmid trägt die Biothesegene *crtY*, *crtB*, *crtI* und *crtY* von *Erwinia uredovora*, das Gen *gps* (für Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase) aus *Archaeoglobus fulgidus* und das Gen *idi* (Isopentenyldiphosphat-Isomerase) aus *E. coli*. Mit diesem Konstrukt wurden limitierende Schritte für eine hohe Akkumulation von Carotinoiden und deren biosynthetischen Vorstufen beseitigt. Dies wurde zuvor von Wang et al. in ähnlicher Weise mit mehreren Plasmiden beschrieben (Wang, C.-W., Oh, M.-K. und Liao, J.C.; Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*, Biotechnology and Bioengineering 62 (1999), 235-241).

Kulturen von *E.coli* TOP10 wurden in an sich bekannter Weise mit den beiden Plasmiden pNOSTF-G und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps transformiert und in LB-Medium bei 30°C bzw. 37°C über Nacht kultiviert. Ampicillin (50 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml) und Isopropyl-β-thiogalactosid (1 mmol) wurden in an sich üblicher Weise ebenfalls über

5 Nacht zugegeben.

Zur Isolierung der Carotinoide aus den rekombinanten Stämmen wurden die Zellen mit Aceton extrahiert, das organische Lösungsmittel zur Trockne eingedampft und die Carotinoide mittels HPLC über eine C30-Säule aufgetrennt. Folgende Verfahrensbedingungen wurden eingestellt.

Trennsäule: Prontosil C30-Säule, 250 x 4,6 mm, (Bischoff, Leonberg)

Flussrate: 1.0 ml/min

Eluenten: Laufmittel A - 100% Methanol

15 Laufmittel B - 80% Methanol, 0.2% Ammoniumacetat

Laufmittel C - 100% t-Butyl-methylether

Gradientprofil:

Zeit	Flussrate	% Laufmittel A	% Laufmittel B	% Laufmittel C
1.00	1.0	95.0	5.0	0
1.05	1.0	80.0	5.0	15.0
14.00	1.0	42.0	5.0	53.0
14.05	1.0	95.0	5.0	0
17.00	1.0	95.0	5.0	0
18.00	1.0	95.0	5.0	0

20

Detektion: 300 - 500 nm

Die Spektren wurden direkt aus den Elutionspeaks unter Verwendung eines Photodiodearraydetektors bestimmt. Die isolierten Substanzen wurden über ihre Absorptionspektren und ihre Retentionszeiten im Vergleich zu Standardproben identifiziert.

Abbildung 1 zeigt die chromatographische Analyse einer Probe erhalten aus einem mit pNOSTF-G und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps transformierten *E. coli*-Stamm. Es zeigt sich,

daß dieser Stamm aufgrund der heterologen Komplementation verschiedene Ketocarotinoide synthetisieren kann. Mit zunehmender Retentionszeit werden Astaxanthin (Peak 1), Adonirubin (Peak 2) und Canthaxanthin (Peak 3) eluiert.

5      Beispiel 3.1

Vergleichsbeispiel

Analog zu den vorhergehenden Beispielen wurde als Vergleichsbeispiel ein *E.coli*-Stamm hergestellt, der eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis Flotow em. Wille* exprimiert. Dazu wurde die cDNA die für die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis Flotow em. Wille* codiert amplifiziert und gemäß Beispiel 1 in den gleichen Expressionsvektor kloniert.

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* codiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen")Suspensionskultur amplifiziert. Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*- Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.02 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers PR1 (gcaagctcga cagctacaaa cc) in cDNA umgeschrieben.

Die Nukleinsäure codierend eine Ketolase aus Haematococcus pluvialis (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus Haematococcus pluvialis unter Verwendung eines sense spezifischen Primers PR2 (gaagcatgca gcttagcagcg acag) und eines antisense spezifischen Primers PR1 amplifiziert.

5

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem  
10 enthalten war:

- 4 ml einer Haematococcus pluvialis cDNA (hergestellt wie oben beschrieben).
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1
- 15 - 0.2 mM PR2
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

20 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94\_C 2 Minuten  
 35X 94\_C 1 Minute  
 53\_C 2 Minuten  
 25 72\_C 3 Minuten  
 1X 72\_C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR1 und PR2 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das  
für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert:

30	gaagcatgca gcttagcagcg acagtaatgt tggaggcagct taccggaaagc gctgaggcac	60
	tcaaggagaa ggagaaggag gttgcaggca gctctgacgt gttgcgtaca tgggcaccc	120
	agtactcgct tccgtcagag gagtcagacg cggcccgccc gggactgaag aatgcctaca	180
	agccaccacc ttccgacaca aagggcatca caatggcgct agctgtcattt ggctccctgg	240
35	ccgcagtgtt cctccacgccc atttttcaaa tcaagcttcc gaccccttgc gaccagctgc	300
	actggctgcc cgtgtcagat gccacagctc agctggtagt cggcagcagc agcctgctgc	360
	acatcgctgt agtattcttt tccttgagat tcctgtacac aggccctttt atcaccacgc	420
	atgatgttat gcatggcacc atcggccatga gaaacaggca gcttaatgac ttcttggca	480
40	gagtatgtat ctccctgtac gcctggttt attacaacat gctgcaccgc aagcattggg	540
	agcaccacaa ccacactggc gaggtggcca aggaccctga cttccacagg ggaaaaccctg	600
	gcattgtgcc ctgggtggc agcttcatgt ccagctacat gtcgtatgtt cagttgcgc	660
	gcctcgatg gtggacggtg gtcatgcagc tgctgggtgc gccaatggcg aacctgctgg	720

5	tgttcatggc ggccgcgccc atcctgtccg cttccgcgt gtttacttt ggcacgtaca	780
	tgccccacaa gcctgagcct ggccgcggt caggcttc accagccgtc atgaacttgt	840
	ggaagtgcgc cactagccag gcgtccgacc tggtcagtt tctgacctgc taccactcg	900
	acctgcactg ggagcaccac cgctggccct ttggcccttg gtgggagctg cccaactgcc	960
	gcccctgtc tggccgaggt ctgttctgt cctagctgga cacactgcag tggccctgc	1020
	tgccagctgg gcatgcagg tggccgagga ctgggtgagg tgaaaagctg caggcgctgc	1080
	tgccggacac gctgcattgg ctaccctgtg tagctgcgc cactagggga gggggtttgt	1140
	agctgtcgag cttgc	

- 10 Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

15 Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigem Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80.

- 20 Dieser Klon wurde für die Klonierung in den unter Beispiel 1 beschriebenen Expressionsvektor verwendet. Die Klonierung erfolgte analog wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Transformation der *E.coli* Stämme, deren Kultivierung und die Analyse des Carotinoidprofils erfolgte wie in Beispiel 3 beschrieben.
- 25 Abbildung 2 zeigt die chromatographische Analyse einer Probe erhalten aus einem mit diesem Expressionsvektor und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps transformierten *E. coli*-Stamm. Unter Verwendung einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis*, wie beispielsweise in EP 725137 beschrieben, eluieren mit zunehmender Retentionszeit Astaxanthin (Peak 1), Adonixanthin (Peak 2) und nicht umgesetztes Zeaxanthin (Peak 3). Dieses Carotinoidprofil wurde bereits in EP 0725137 beschrieben.

30 Tabelle 1 zeigt einen Vergleich der bakteriell produzierten Carotinoidmengen:

Tablelle 1: Vergleich der bakteriellen Ketocarotinoid-Synthese bei Verwendung zweier verschiedener Ketolasen, der erfindungsgemäßen NOST-Ketolase aus *Nostoc sp.* PCC7120 (Beispiel 3) und der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als Vergleichsbeispiel (Beispiel 3.1). Carotinoidmengen sind in ng/ ml Kulturflüssigkeit angegeben.

Ketolase aus	Astaxanthin	Adonirubin	Adonixanthin	Canthaxanthin	Zeaxanthin
<i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow em. Wille (Vergleichsbeispiel)	13		102		738
<i>Nostoc sp. Strain</i> <i>PCC7120</i>	491	186		120	

Die erfindungsgemäße Expression der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* führt zu einem Carotinoidmuster, welches sich von dem Carotinoidmuster nach Expression einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* deutlich unterscheidet. Während die Ketolase aus dem Stand der Technik nur sehr unvollständig das gewünschte Ketocarotinoid Astaxanthin liefert, ist Astaxanthin bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Ketolase das Hauptprodukt. Im erfindungsgemäßen Verfahren treten hydroxylierte Nebenprodukte in einer deutlich geringeren Menge auf.

10 Beispiel 4:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Nostoc sp. PCC 7120* NOST-Ketolase in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

Die Expression der NOST-Ketolase aus *Nostoc sp. PCC7120* in *L. esculentum* und in

15 *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin-NADPH-Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

20 Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-A (SEQ ID No.38) und FNR-B (SEQ ID No. 39) hergestellt.

25 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotorfragment FNR#1 ) beinhaltet, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomicscher DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM FNR-A (SEQ ID No. 38)
- 0.2 mM FNR-B (SEQ ID No. 39)
- 5 - 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ul Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 10      1X    94°C 2 Minuten  
●      35X   94°C 1 Minute  
      50°C 1 Minute  
      72°C 1 Minute  
15      1X    72°C 10 Minuten

Das 647 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR#1 erhalten.

- 20      Sequenzierung des Klons pFNR#1 bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474; WO03/006660) von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert.  
● 25      pFNR wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

- 30      Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 637 bp SacI-HindIII Fragmentes aus pFNR#1 (partielle SacI Hydrolyse) und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter FNR#1 anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJITFNR.

Zur Herstellung einer Expressionskassette pJFNRNOST wurde das 799 bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor

pJITFNR kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJFNRNOST.

- Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium vermittelte Transformation der Ketolase aus *Nostoc* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3FNR:NOST (MSP101) wurde das 2.425 bp Sacl-Xhol Fragment (partielle Sacl Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem Sacl-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 3, Konstrukt-karte). In der Abbildung 3 beinhaltet Fragment *FNR-Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP Fragment* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *Nost Ketolase CDS* (777 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die *Nostoc* Ketolase, Fragment *35S Term* (746 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

- Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).
- Zur Herstellung des Tagetes-Expressionsvektors pS5FNR:NOST (MSP102) wurde das 2.425 bp Sacl-Xhol Fragment (partielle Sacl Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem Sacl-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 4, Konstrukt-karte). In der Abbildung 4 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS Transit Peptide* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *Nost Ketolase* (777 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die *Nostoc* Ketolase, Fragment *35S Terminator* (746 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

#### Beispiel 5:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Nostoc* sp.

- PCC 7120 NOST-Ketolase in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomicscher DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer AP3-1 (SEQ ID No.41) und AP3-2 (SEQ ID No. 42) hergestellt.

5

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

10

- 100 ng genomicscher DNA aus *A.thaliana*
  - 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 41)
  - 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 42)
- 15 - 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ul Pfu Polymerase (Stratagene)
  - 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

20

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

50°C 1 Minute

72°C 1 Minute

25 1X 72°C 10 Minuten

Das 929 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3 erhalten.

30 Sequenzierung des Klons pAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert

und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten Arabidopsis thaliana Pflanzen.

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pAP3 hergestellt. Die Region 10200 - 9771 wurde mit den Primern AP3-1 (SEQ ID No. 41) und Primern AP3-4 (SEQ ID No. 44) amplifiziert (Amplifikat A1/4), die Region 9526-9285 wurde mit den AP3-3 (SEQ ID No. 43) und AP3-2 (SEQ ID No. 42) amplifiziert (Amplifikat A2/3).

10 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200 - 9771 und Region 9526-9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 ul Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 15
- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
  - 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM sense Primer (AP3-1 SEQ ID No. 41 bzw. AP3-3 SEQ ID No. 43)
  - 0.2 mM antisense Primer (AP3-4 SEQ ID No. 44 bzw. AP3-2 SEQ ID No. 42)
- 20
- 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
  - 0.25 ul Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
  - 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 25
- 1X 94°C 2 Minuten
  - 35X 94°C 1 Minute
  - 50°C 1 Minute
  - 72°C 1 Minute
- 30
- 1X 72°C 10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A1/4 und A2/3, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte 35 Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 - 9526 deletiert sind.

Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A1/4 und A2/3 erfolgte in einem 17.6 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 0.5 ug A1/4 Amplifikat  
- 0.25 ug A2/3 Amplifikat

Das Auffüllen der 3'-Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 10 - 17.6 ul A1/4 und A2/3-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)  
- 50 uM dNTPs  
- 2 ul 1X Klenow Puffer  
- 2U Klenow Enzym

15 Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AP3-1 SEQ ID No. 41) und eines antisense spezifischen Primers (AP3-2 SEQ ID No. 42) amplifiziert.

20 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 25 - 1 ul Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)  
- 0.25 mM dNTPs  
- 0.2 mM AP3-1(SEQ ID No. 41)  
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 42)  
- 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 30 - 0.25 ul Pfu Taq Polymerase (Stratagene)  
- 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 35 1X 94°C 2 Minuten  
35X 94°C 1 Minute

50°C 1 Minute  
72°C 1 Minute  
1X 72°C 10 Minuten

- 5 Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 41 (AP3-1) und SEQ ID No. 42 (AP3-2) resultierte in einem 777 Bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3P erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die 10 interne Region 9285 - 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

- Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 767 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus 15 pAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJL-TAP3P. Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3NOST wurde das 799 Bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJLTAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJAP3PNOST.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus Nostoc in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

- 25 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3:NOST (MSP103) wurde das 2.555 bp SacI-Xhol Fragment aus pJAP3NOST mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 5, Konstruktkarte). In der Abbildung 5 beinhaltet Fragment AP3P PROMOTER den modifizierten AP3P Promoter ( 765 bp), Fragment rbcS TP 30 FRAGMENT das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NOST KETOLASE CDS (777bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die Nostoc Ketolase, Fragment 35S TERM (746 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus Nostoc in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

- 5 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3:NOST (MSP104) wurde das 2.555 bp SacI-Xhol Fragment aus pS5AP3PNOST mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 6, Konstruktkarte). In der Abbildung 6 beinhaltet Fragment AP3P PROMOTER den modifizierten AP3P Promoter (765 bp), Fragment rbcS TP FRAGMENT das rbcS Transitpeptid aus Erbse (207 bp), Fragment NOST KETOLASE CDS (777 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die Nostoc Ketolase, Fragment 35S TERM (746 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.
- 10 15

- Beispiel 6  
Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NP196-Ketolase aus  
Nostoc *punctiforme* ATCC 29133 kodiert

Die DNA, die für die NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (Stamm der "American Type Culture Collection") amplifiziert.

20 Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0.04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0.075 g/l MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1ml Trace Metal Mix "A5+Co" (2.86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.39 g/l Na-MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.079 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

25 30

Protokoll für die DNA-Isolation aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133:

Aus einer 10 ml Flüssiggkultur wurden die Bakterienzellen durch 10 minütige Zentrifugation bei 8000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10mM Tris\_HCl (pH 7.5) resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2ml Vo-

Iumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß

5 überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zuge-gabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol ge-fällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raum-temperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

10 Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc punctiforme ATCC 29133*, wur-de mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc punctiforme ATCC 29133* unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NP196-1, SEQ ID No. 54) und eines antisense-spezifischen Primers (NP196-2 SEQ ID No. 55) amplifiziert.

15 15 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem ent-20 halten war

- 1 ul einer *Nostoc punctiforme ATCC 29133* DNA (hergestellt wie oben beschrie-25 ben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NP196-1 (SEQ ID No. 54)
- 0.2 mM NP196-2 (SEQ ID No. 55)
- 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ul Aq. Dest.

30 30 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

35 55°C 1 Minuten

72°C	3 Minuten	
1X	72°C	10 Minuten

- Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 54 und SEQ ID No. 55 resultierte in einem 792
- 5 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (NP196, SEQ ID No. 56). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pNP196 erhalten.
- 10 Sequenzierung des Klons pNP196 mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 140.571-139.810 des Datenbank-  
eintrages NZ\_AABC01000196 identisch ist (inverse orientiert zum veröffentlichten Da-  
tenbankeintrag) mit der Ausnahme, daß G in Position 140.571 durch A ersetzt wurde,  
15 um ein Standard-Startkodon ATG zu erzeugen. Diese Nukleotidsequenz wurde in ei-  
nem unabhängigem Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die  
Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc punctiforme* ATCC 29133.

- Dieser Klon pNP196 wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor  
pJIT117(Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.
- 20 pJIT117 wurde modifiziert, indem der 35S-Terminator durch den OCS-Terminator (Octo-  
topine Synthase) des Ti-Plasmides pTi15955 von Agrobacterium tumefaciens (Daten-  
bankeintrag X00493 von Position 12,541-12,350, Gielen et al. (1984) EMBO J. 3 835-  
846) ersetzt wurde.
- 25 Das DNA-Fragment, das die OCS-Terminatorregion beinhaltet, wurde mittels PCR un-  
ter Verwendung des Plasmides pHETSGATE (Datenbankeintrag AJ311874, Wesley  
et al. (2001) Plant J. 27 581-590, nach Standardmethoden aus *E.coli* isoliert) sowie der  
Primer OCS-1 (SEQ ID No. 58) und OCS-2 (SEQ ID No. 59) hergestellt.
- 30 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:
- Die PCR zur Amplifikation der DNA, die die Octopin Synthase (OCS) Terminatorregion  
(SEQ ID No. 60) beinhaltet, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten  
35 waren:

- 100 ng pHELLSGATE plasmid DNA
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM OCS-1 (SEQ ID No. 58)
- 0.2 mM OCS-2 (SEQ ID No. 59)
- 5 - 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ul Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 10            1X 94°C 2 Minuten  
●            35X 94°C 1 Minute  
              50°C 1 Minute  
              72°C 1 Minute  
15            1X 72°C 10 Minuten

Das 210 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pOCS erhalten.

- 20 Sequenzierung des Klons pOCS bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf dem Ti-Plasmid pTi15955 von Agrobacterium tumefaciens (Datenbankentrag X00493) von Position 12.541 bis 12.350 übereinstimmt.  
● 25 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 210 bp Sall-Xhol Fragmentes aus pOCS und Ligierung in den Sall-Xhol geschnittenen Vektor pJIT117.  
Dieser Klon heisst pJO und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP196 verwendet.

- 30 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 782 Bp SphI-Fragmentes aus pNP196 und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJO. Der Klon, der die NP196-Ketolase von *Nostoc punctiforme* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJONP196.

Beispiel 7:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

- 5 Die Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin-NADPH-Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem  
10 15 Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).
- Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomicscher DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-1 (SEQ ID No. 61) und FNR-2 (SEQ ID No. 62) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotorfragment FNR (SEQ ID No. 20 63) beinhaltet, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- - 100 ng genomicscher DNA aus *A.thaliana*  
- 0.25 mM dNTPs  
- 0.2 mM FNR-1 (SEQ ID No. 61)  
- 0.2 mM FNR-2 (SEQ ID No. 62)  
- 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)  
- 0.25 ul Pfu Polymerase (Stratagene)  
- 28.8 ul Aq. Dest.  
30 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94°C 2 Minuten  
35X 94°C 1 Minute  
50°C 1 Minute  
35 72°C 1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

Das 652 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR erhalten.

5

Sequenzierung des Klons pFNR bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474) von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt.

10 Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP196 (in Beispiel 6 beschrieben) verwendet.

● Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 644 bp SmaI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den EcoI36II-HindIII geschnittenen Vektor pJONP196. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S und das Fragment NP196 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJOFNR:NP196.

20 Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium vermittelte Transformation der NP196-Ketolase aus *Nostoc* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

● Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP105 wurde das 1.839 bp EcoRI-Xhol Fragment aus pJOFNR:NP196 mit dem EcoRI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 7, Konstruktkafe). In der Abbildung 7 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von der Octopin-Synthase.

30

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektors mit der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *Taraxacum officinale* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO 02/00900).

35

Zur Herstellung des Tagetes-Expressionsvektors MSP106 wurde das 1.839 bp EcoRI-Xhol Fragment aus pJOFNR:NP196 mit dem EcoRI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 8, Konstrukt-karte). In der Abbildung 8 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transit-peptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase , Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Beispiel 8:

- 10 Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*

15 Die Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle des blütenspezifischen Promoters EPSPS aus Petunia hybrida (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787; Benfey et al. (1990) Plant Cell 2: 849-856).

- 20 Das DNA Fragment, das die EPSPS Promoterregion (SEQ ID No. 66) aus Petunia hybrida beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus Petunia hybrida isoliert) sowie der Primer EPSPS-1 (SEQ ID No. 64) und EPSPS-2 (SEQ ID No. 65) hergestellt.

- 25 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das EPSPS-Promoterfragment (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 30
- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
  - 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM EPSPS-1 (SEQ ID No. 64)
  - 0.2 mM EPSPS-2 (SEQ ID No. 65)
- 35
- 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
  - 0.25 ul Pfu Polymerase (Stratagene)

- 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

5    1X    94°C 2 Minuten  
35X    94°C 1 Minute  
            50°C 1 Minute  
            72°C 2 Minute  
1X    72°C 10 Minuten

10

Das 1773 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pEPSPS erhalten.

Sequenzierung des Klons pEPSPS bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich durch  
15    zwei Deletion (Basen ctaagttcagga in Position 46-58 der Sequenz M37029; Basen  
aaaaatat in Position 1422-1429 der Sequenz M37029) und die Basenaustausche (T  
statt G in Position 1447 der Sequenz M37029; A statt C in Position 1525 der Sequenz  
M37029; A statt G in Position 1627 der Sequenz M37029) von der publizierten EPSPS-  
Sequenz (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787) unterscheidet. Die zwei  
20    Deletionen und die zwei Basenaustausche an den Positionen 1447 und 1627 der Se-  
quenz M37029 wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert  
und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten Petu-  
nia hybrida Pflanzen.

25    Der Klon pEPSPS wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP196  
(in Beispiel 6 beschrieben) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1763 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus  
pEPSPS und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJONP196. Der Klon,  
30    der den Promoter EPSPS anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst  
pJOESP:NP196. Diese Expressionskassette enthält das Fragment NP196 in der kor-  
rekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS-Transitpeptid.

35    Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transfor-  
mation der EPSPS-kontrollierten NP196-Ketolase aus Nostoc punctiforme ATCC

29133 in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP107 wurde das 2.961 KB bp SacI-Xhol

- 5 Fragment aus pJOESP:NP196 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 9, Konstrukt-karte). In der Abbildung 9 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

● Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

- 15 Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP108 wurde das 2.961 KB bp SacI-Xhol Fragment aus pJOESP:NP196 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 10, Konstrukt-karte). In der Abbildung 10 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase , Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Beispiel 9:

- 5 Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert

Die DNA, die für die NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (Stamm der "American Type Culture Collection") amplifiziert. Die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 wurde in Beispiel 19 beschrieben.

Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NP195-1, SEQ ID No. 67) und eines antisense-spezifischen Primers (NP195-2 SEQ ID No. 68) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem ent-

5 halten war:

- 1 ul einer *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 10 - 0.2 mM NP195-1 (SEQ ID No. 67)
- 0.2 mM NP195-2 (SEQ ID No. 68)
- 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- - 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ul Aq. Dest.

15

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten  
35X 94°C 1 Minute  
20 55°C 1 Minuten  
72°C 3 Minuten  
1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 67 und SEQ ID No. 68 resultierte in einem 819

● 5 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (NP195, SEQ ID No. 69). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pNP195 erhalten.

30 Sequenzierung des Klons pNP195 mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 55,604-56,392 des Datenbank-eintrages NZ\_AABC010001965 identisch ist, mit der Ausnahme, daß T in Position 55.604 durch A ersetzt wurde, um ein Standard-Startkodon ATG zu erzeugen. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigem Amplifikationsexperiment reprodu-

ziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc punctiforme* ATCC 29133.

Dieser Klon pNP195 wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJ0 (in Beispiel 6 beschrieben) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 809 Bp SphI-Fragmentes aus pNP195 und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJ0. Der Klon, der die NP195-Ketolase von *Nostoc punctiforme* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJONP195.

10

Beispiel 10:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

15 Die Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin-NADPH-Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaár 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem 20 Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

Der Klon pFNR (in Beispiel 7 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP195 (in Beispiel 10 beschrieben) verwendet.

25

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 644 bp Sma-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den Ecl136II-HindIII geschnittenen Vektor pJONP195. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S und das Fragment NP195 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJOFNR:NP195.

30

Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium vermittelte Transformation der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

35

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP109 wurde das 1.866 bp EcoRI-Xhol Fragment aus pJOFNR:NP195 mit dem EcoRI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 li-

giert (Abbildung 11, Konstruktkarte). In der Abbildung 11 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von der Octopin-Synthase.

5 Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* punctiforme in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5  
10 (WO 02/00900).

● Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors MSP110 wurde das 1.866 bp EcoRI-Xhol Fragment aus pJOFNR:NP195 mit dem EcoRI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 12, Konstruktkarte). In der Abbildung 12 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

20 Beispiel 11:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

● 25 Die Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle des blütenspezifischen Promoters EPSPS aus *Petunia hybrida* (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787; Benfey et al. (1990) Plant Cell 2: 849-856).

30 Der Klon pEPSPS (in Beispiel 8 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP195 (in Beispiel 10 beschrieben) verwendet.

35 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1763 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pEPSPS und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJONP195. Der Klon, der den Promoter EPSPS anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst

pJOESP:NP195. Diese Expressionskassette enthält das Fragment NP195 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS-Transitpeptid.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transfor-

- 5 mation der EPSPS-kontrollierten NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO 02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP111 wurde das 2.988 KB bp SacI-Xhol

- 10 Fragment aus pJOESP:NP195 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 13, Konstruktkarte). In der Abbildung 13 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

15 Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

- 20 Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP112 wurde das 2.988 KB bp SacI-Xhol Fragment aus pJOESP:NP195 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 14, Konstruktkarte). In der Abbildung 14 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Beispiel 12:

- 30 Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumiginea NSOR10* codiert.

Die DNA, die für die Ketolase aus *Nodularia spumiginea NSOR10* kodiert, wurde mittels PCR aus *Nodularia spumiginea NSOR10* amplifiziert.

- Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nodularia spumignea NSOR10*, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0.04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0.075 g/l MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1ml Trace Metal Mix "A5+Co" (2.86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.39 g/l NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.079 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.
- 10 Protokoll für die DNA-Isolation aus *Nodularia spumignea NSOR10*:
- Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10 minütige Zentrifugation bei 8000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 15 10mM Tris\_HCl (pH 7.5) resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.
- 20 25 Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10*, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nodularia spumignea NSOR10* unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NODK-1, SEQ ID No. 71) und eines antisense-spezifischen Primers (NODK-2 SEQ ID No. 72) amplifiziert.
- 30 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:
- Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ul einer *Nodularia spumignea* NSOR10 DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NODK-1 (SEQ ID No. 71)
- 5 - 0.2 mM NODK-2 (SEQ ID No. 72)
- 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ul Aq. Dest.

10 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94°C 2 Minuten
- 35X 94°C 1 Minute  
55°C 1 Minuten
- 15 72°C 3 Minuten
- 1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 71 und SEQ ID No. 72 resultierte in einem 720 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert 20 (NODK, SEQ ID No. 73). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pNODK erhalten.

25 Sequenzierung des Klons pNODK mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 2130-2819 des Datenbank-eintrages AY210783 identisch ist (inverse orientiert zum veröffentlichten Datenbankeintrag). Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigem Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nodularia spumignea* NSOR10.

30 Dieser Klon pNODK wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJO (in Beispiel 6 beschrieben) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 710 Bp SphI-Fragmentes aus pNODK und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJO. Der Klon, der die NODK-Ketolase von *Nodularia spumignea* in der korrekten Orientie-

rung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJONODK.

Beispiel 13:

- 5 Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

Die Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR

- 10 (Ferredoxin-NADPH- Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

15

Der Klon pFNR (in Beispiel 7 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONODK (in Beispiel 12 beschrieben) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 644 bp Sma-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den Ecl136II-HindIII geschnittenen Vektor pJONODK. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S und das Fragment NODK in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJOFNR:NODK.

- 20 5 Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium vermittelte Transformation der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP113 wurde das 1.767 bp EcoRI-Xhol

30 Fragment aus pJOFNR:NODK mit dem EcoRI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 15, Konstruktakarte). In der Abbildung 15 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NODK KETO CDS* (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumignea NSOR10* NODK-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von der Octopin-Synthase.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektors mit der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10 punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

5

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors MSP114 wurde das 1.767 bp EcoRI-Xhol Fragment aus pJOFNR:NODK mit dem EcoRI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 16, Konstruktkarte). In der Abbildung 16 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NODK KETO CDS* (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumignea NSOR10* NODK-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Beispiel 14:

15 Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

20 Die Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al.: 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle des blütenspezifischen Promoters EPSPS aus Petunia hybrida (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787; Benfey et al. (1990) Plant Cell 2: 849-856).

25 Der Klon pEPSPS (in Beispiel 8 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONODK (in Beispiel 12 beschrieben) verwendet.

30 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1763 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pEPSPS und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJ0NODK. Der Klon, der den Promoter EPSPS anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJOESP:NODK. Diese Expressionskassette enthält das Fragment NODK in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS-Transitpeptid.

35 Die Herstellung eines Expressionsvektors für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10*

in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO 02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP115 wurde das 2.889 KB bp SacI-Xhol  
5 Fragment aus pJOESP:NODK mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert  
(Abbildung 17, Konstrukt-karte). In der Abbildung 17 beinhaltet Fragment EPSPS den  
EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid  
aus Erbse (194 bp), Fragment *NODK KETO CDS* (690 bp), kodierend für die *Nodularia*  
*spumiginea NSOR10* NODK-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polya-  
10 denylierungssignal von Octopin-Synthase.

● Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transfor-  
mation der EPSPS-kontrollierten NODK-Ketolase aus *Nodularia spumiginea NSOR10*  
in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5  
15 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP116 wurde das 2.889 KB bp SacI-Xhol  
Fragment aus pJOESP:NODK mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert  
(Abbildung 18, Konstrukt-karte). In der Abbildung 18 beinhaltet Fragment EPSPS den  
EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid  
aus Erbse (194 bp), Fragment *NODK KETO CDS* (690 bp), kodierend für die *Nodularia*  
*spumiginea NSOR10* NODK-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polya-  
denylierungssignal von Octopin-Synthase.

● 25 Beispiel 15:  
Herstellung transgener *Lycopersicon esculentum* Pflanzen

Transformation und Regeneration von Tomatenpflanzen erfolgte nach der publizierten  
Methode von Ling und Mitarbeitern (Plant Cell Reports (1998), 17:843-847). Für die  
30 Varietät Microtom wurde mit höherer Kanamycin-Konzentration (100mg/L) selektioniert.

Als Ausgangsexplantat für die Transformation dienten Kotyledonen und Hypokotyle  
sieben bis zehn Tage alter Keimlinge der Linie Microtom. Für die Keimung wurde das  
Kulturmedium nach Murashige und Skoog (1962: Murashige and Skoog, 1962, Physiol.  
35 Plant 15, 473-) mit 2% Saccharose, pH 6,1 verwendet. Die Keimung fand bei 21°C bei  
wenig Licht (20 - 100 µE) statt. Nach sieben bis zehn Tagen wurden die Kotyledonen

- quer geteilt und die Hypokotyle in ca. 5 - 10 mm lange Abschnitte geschnitten und auf das Medium MSBN (MS, pH 6,1, 3% Saccharose + 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA) gelegt, das am Vortag mit suspensionskultivierten Tomatenzellen beschickt wurde. Die Tomatenzellen wurden luftblasenfrei mit sterilem Filterpapier abgedeckt. Die Vorkultur der
- 5 Explantate auf dem beschriebenen Medium erfolgte für drei bis fünf Tage. Zellen des Stammes Agrobakterium tumefaciens LBA4404 wurden einzeln mit den Plasmiden pS3FNR:NOST, pS3AP3:NOST, pS3FNR:NP196, pS3EPS:NP196, pS3FNR:NP195, pS3EPS:NP195, pS3FNR:NODK und pS3EPS:NODK transformiert. Von den einzelnen mit den Binärvektoren pS3FNRNOST, pS3AP3NOST, pS3FNR:NP196,
- 10 pS3EPS:NP196, pS3FNR:NP195, pS3EPS:NP195, pS3FNR:NODK und pS3EPS:NODK transformierten Agrobakterium-Stämmen wurde jeweils eine Übernachtkultur in YEB Medium mit Kanamycin (20 mg/l) bei 28 °C kultiviert und die Zellen zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit flüssigem MS Medium (3% Saccharose, pH 6,1) resuspendiert und auf eine optische Dichte von 0,3 (bei 600 nm) eingestellt.
- 15 Die vorkultivierten Explantate wurden in die Suspension überführt und für 30 Minuten bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Explantate mit sterilem Filterpapier getrocknet und für die dreitägige Co-Kultur (21°C) auf ihr Vorkulturmedium zurück gelegt.
- 20 Nach der Co-kultur wurden die Explantate auf MSZ2 Medium (MS pH 6,1 + 3% Saccharose, 2 mg/l Zeatin, 100 mg/l Kanamycin, 160 mg/l Timentin) transferiert und für die selektive Regeneration bei 21°C unter Schwachlicht Bedingungen (20 - 100 µE, Lichtrhythmus 16h/8h) aufbewahrt. Aller zwei bis drei Wochen erfolgte der Transfer der Explantate bis sich Sprosse bilden. Kleine Sprosse konnten vom Explantat abgetrennt werden und auf MS (pH 6,1 + 3% Saccharose) 160 mg/l Timentin, 30 mg/l Kanamycin, 0,1 mg/l IAA bewurzelt werden. Bewurzelte Pflanzen wurden ins Gewächshaus überführt.
- 25 Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:
- Mit pS3FNR:NOST wurde erhalten: MSP101-1, MSP101-2, MSP101-3
- Mit pS3AP3:NOST wurde erhalten: MSP103-1, MSP103-2, MSP103-3

Mit pS3FNR:NP196 wurde erhalten: MSP105-1, MSP105-2, MSP105-3

Mit pS3EPS:NP196 wurde erhalten: MSP107-1, MSP107-2, MSP107-3

5 Mit pS3FNR:NP195 wurde erhalten: MSP109-1, MSP109-2, MSP109-3

Mit pS3EPS:NP195 wurde erhalten: MSP111-1, MSP111-2, MSP111-3

Mit pS3FNR:NODK wurde erhalten: MSP113-1, MSP113-2, MSP113-3

10

Mit pS3EPS:NODK wurde erhalten: MSP115-1, MSP115-2, MSP115-3

● Beispiel 16:

Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

15

Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2% Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18-28°C/20-200 µE/3 - 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20-70 µE, für 4-8 Wochen.

20

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 - 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS - Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

● 5

Ein beliebiger Agrobakterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarken (bevorzugt *bar* oder *paf*) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reporter-gene tragen kann wird (pS5FNR:NOST,pS5AP3:NOST pS5FNR:NP196,

30 pS5EPS:NP196, pS5FNR:NP195, pS5EPS:NP195, pS5FNR:NODK und pS5EPS:NODK), über Nacht angezogen und für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit 35 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und

derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, daß eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wird für die C-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

- Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 – 80 µMol/m<sup>2</sup> x sec, Temperatur: 22 – 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

- Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sproßknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberellinsäure GA<sub>3</sub>, zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.
- Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 - 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert

werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.

Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.

Die Zugabe von  $\text{AgNO}_3$  (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.

10 Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.

► Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

20 Mit pS5FNR:NOST wurde beispielsweise erhalten: MSP102-1, MSP102-2, MSP102-3,

Mit pS5AP3:NOST wurde beispielsweise erhalten: MSP104-1, MSP104-2, MSP104-3

Mit pS5FNR:NP196 wurde erhalten: MSP106-1, MSP106-2, MSP106-3

25 Mit pS5EPS:NP196 wurde erhalten: MSP108-1, MSP108-2, MSP108-3

Mit pS5FNR:NP195 wurde erhalten: MSP110-1, MSP110-2, MSP110-3

30 Mit pS5EPS:NP195 wurde erhalten: MSP112-1, MSP112-2, MSP112-3

Mit pS5FNR:NODK wurde erhalten: MSP114-1, MSP114-2, MSP114-3

Mit pS5EPS:NODK wurde erhalten: MSP116-1, MSP116-2, MSP116-3

## Beispiel 17

## Charakterisierung der transgenen Pflanzenblüten

## Beispiel 9.1

- 5 Trennung von Carotinoideestern in Blütenblättern transgener Pflanzen

## Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Blütenblätter der transgenen Pflanzen werden in flüssigem Stickstoff gemörsernt  
10 und das Petalenpulver (etwa 40 mg) mit 100% Aceton extrahiert (dreimal je 500 ul). Das Lösungsmittel wird evaporiert und die Carotinoide in 100-200 ul Petrolether/Aceton (5:1, v/v) resuspendiert.

Die Carotinoide werden in konzentrierter Form mittels Dünnschicht-Chromatographie  
15 (TLC) auf Silica60 F254- Platten (Merck) in einem organischen Laufmittel (Petrol-ether/Aceton; 5:1) entsprechend ihrer Phobizität aufgetrennt. Gelbe (Xanthophyllester), rote (Ketocarotinoidester) und orange Banden (Mischung aus Xanthophyll- und Ketocarotinoideestern) auf der TLC werden ausgekratzt.  
20 Die an Silica gebundenen Carotinoide werden dreimal mit 500 ul Aceton eluiert, das Lösungsmittel evaporiert und die Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt und identifiziert.

Mittels einer C30-reverse phase-Säule kann zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al.(2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Folgende Verfahrensbedingungen wurden eingestellt.  
25

Trennsäule: Prontosil C30-Säule, 250 x 4,6 mm, (Bischoff, Leonberg)  
Flussrate: 1.0 ml/min  
30 Eluenten: Laufmittel A - 100% Methanol  
Laufmittel B - 80% Methanol, 0.2% Ammoniumacetat  
Laufmittel C - 100% t-Butyl-methylether

## Gradientprofil:

Zeit	Flussrate	% Laufmittel A	% Laufmittel B	% Laufmittel C
12.0	1.0	95.0	5.0	0
12.1	1.0	80.0	5.0	15.0
22.0	1.0	76.0	5.0	19.0
22.0	1.0	66.5	5.0	28.5
38.0	1.0	15.0	5.0	80.0
45.0	1.0	95.0	5.0	0
46.0	1.0	95.0	5.0	0
46.1	1.0	95.0	5.0	0

Detektion: 300 - 500 nm

- 5 Eine Identifizierung der Carotinoide ist aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

Petalenmaterial der transgenen Tomatenpflanzen wird gemörser und mit Aceton extrahiert. Extrahierte Carotinoide werden mittels TLC aufgetrennt. In den Linien können Mono- und Diester von Ketocarotinoiden detektiert werden; die Monoester sind in deutlich geringerer Konzentration als die Diester vorhanden.

## Beispiel 18

## Enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide

- 15 Allgemeine Arbeitsvorschrift

Gemörseretes Petalenmaterial (30-100 mg Frischgewicht) wird mit 100% Aceton (dreimal 500ul; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 495 ul Aceton aufgenommen, 4,95 ml Kalium-phosphatpuffer (100 mM, pH7.4) zugegeben und gut gemischt. Danach erfolgt die Zugabe von ca. 17 mg Bile-Salze (Sigma) und 149 µl einer NaCl/CaCl<sub>2</sub>-Lösung (3M NaCl und 75 mM CaCl<sub>2</sub>). Die Suspension wird für 30 Minuten bei 37C inkubiert. Für die enzymatische Hydrolyse der Carotinoidester wird 595 µl einer Lipaselösung (50 mg/ml Lipase Typ7 von Candida rugosa(Sigma)) zugegeben und unter Schütteln bei 37C inkubiert. Nach etwa 21 Stunden erfolgte nochmals eine Zugabe von 595 µl Lipase mit erneuter Inkubation von mindestens 5 Stunden bei 37C. Anschließend werden

- etwa ca. 700 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O in der Lösung gelöst. Nach Zugabe von 1800 µl Petrolether werden die Carotinoide durch kräftig Mischen in die organische Phase extrahiert. Dieses Ausschütteln wird solange wiederholt, bis die organische Phase frablos bleibt. Die Petroletherfraktionen werden vereinigt und der Petrolether evaporiert. Freie  
5 Carotinoide werden in 100-120 µl Aceton aufgenommen. Mittels HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, und die veränderte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Organismen verwendet, die als Wildtyp bereits eine Ketolase-Aktivität aufweisen, und die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp bewirkt.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Ketolase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren in den Organismus einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Organismen verwendet, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität aufweisen und die genetische Veränderung eine Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp verursacht.
- 30 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Organismen verwendet, die transgen eine Ketolase, enthaltend die Ami-

nosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, exprimieren.

- 5
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Ursachung der Genexpression Nukleinsäuren in die Organismen einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

10

  8. Verfahren nach Anspruch 5 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 einbringt.

15

  9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Organismen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, aufweisen.

20

  10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur zusätzlichen Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und Nukleinsäuren, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp erhöht.

25

  11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase in den Organismus einbringt.

30

  12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, Nukleinsäuren einbringt, die eine Hydroxylase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren

35

abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäure-  
ebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 aufweist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass  
5 Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 einbringt.
14. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nuklein-  
säure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, Nukleinsäuren einbringt, die eine  $\beta$ -Cyclase  
10 kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von die-  
ser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abge-  
leitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene  
mit der Sequenz SEQ ID NO: 18 aufweist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass  
15 Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 17 einbringt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass  
20 man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Organismen erntet und an-  
schließend die Ketocarotinoide aus den Organismen isoliert.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet daß  
25 man als Organismus einen Organismus verwendet, der als Ausgangsorganis-  
mus natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung oder Umregulie-  
rung von Stoffwechselwegen in der Lage ist, Carotinoide herzustellen.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß  
30 man als Organismen Mikroorganismen oder Pflanzen verwendet.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorga-  
nismen Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze verwendet.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen  
35 ausgewählt sind aus der Gruppe *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobac-  
terium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc*, Cyanobakterien der Gattung *Synecho-  
cystis*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Phaffia*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Tri-*

*choderma, Ashbya, Neurospora, Blakeslea, Phycomyces, Fusarium, Haemato-*  
*coccus, Phaedactylum tricornatum, Volvox oder Dunaliella.*

21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus Pflanzen verwendet.
- 5  
● 22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae verwendet.
- 10  
● 15 23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcurbita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochaeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia verwendet.
- 20  
● 25 24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketocarotinoide ausgewählt sind aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echininenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

25. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase

A für den Fall, dass der Wildtyporganismus bereits eine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und

B für den Fall, dass der Wildtyporganismus keine Ketolase-Aktivitätaufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht

10 und die nach A erhöhte oder nach B verursachte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

15 26. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.

25 27. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in den Organismus einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

30 28. Genetisch veränderter Organismus, enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion

von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

29. Genetisch veränderter Organismus, enthaltend mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
- 10 30. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und  $\beta$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 15 31. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 30, dadurch gekennzeichnet daß er als Ausgangsorganismus natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung in der Lage ist, Carotinoide herzustellen.
- 20 32. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 31, ausgewählt aus der Gruppe Mikroorganismen oder Pflanzen.
- 25 33. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.
- 30 34. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc*, Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium*, *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornutum*, *Volvox* oder *Dunaliella*.
35. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen ausgewählt sind aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Bras-

siceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae verwendet.

5

36. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass Pflanzen ausgewählt sind aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcurbita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phytema, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia verwendet.
- 10
- 20
37. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 als Futter- oder Nahrungsmittel.
- 15
- 25
38. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmittel.
- 30
39. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 4 nicht enthalten ist.
40. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abge-

35

leitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 aufweist.

41. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 12 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäure-  
5 ebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 12 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 6 nicht enthalten ist.
- 10 42. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 49 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50 % auf Aminosäure-  
● ebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 49 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 47 nicht enthalten ist.  
15
43. Nukleinsäure, kodierend ein Protein gemäß einem der Ansprüche 39 bis 42, mit der Maßgabe, dass die Sequenz SEQ ID NO: 5 nicht enthalten ist.
44. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4.  
20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.  
●
- 25 45. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.  
30
46. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO.  
47 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 47 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.  
35

100

Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch veränderten Organismen

Zusammenfassung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Organismen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

10

Abbildung 1

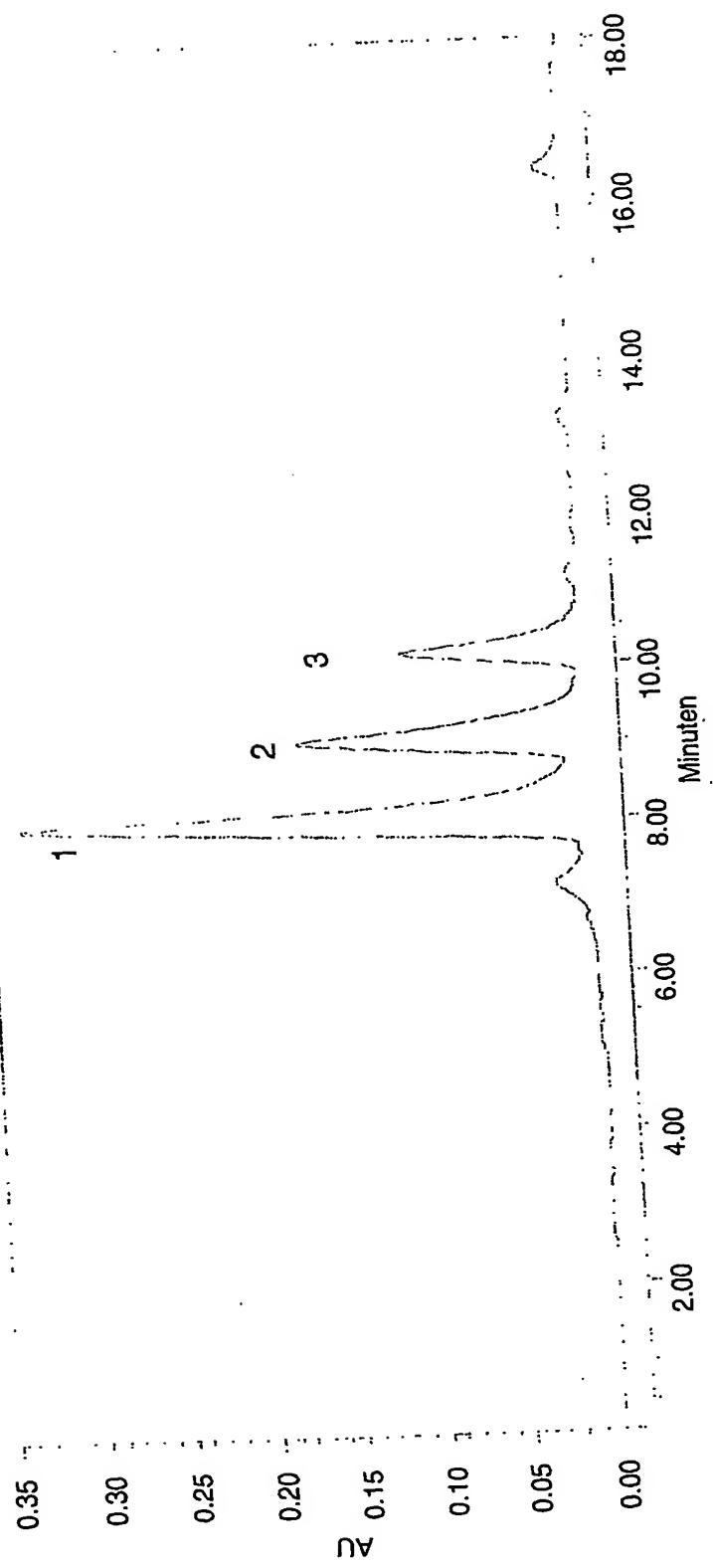
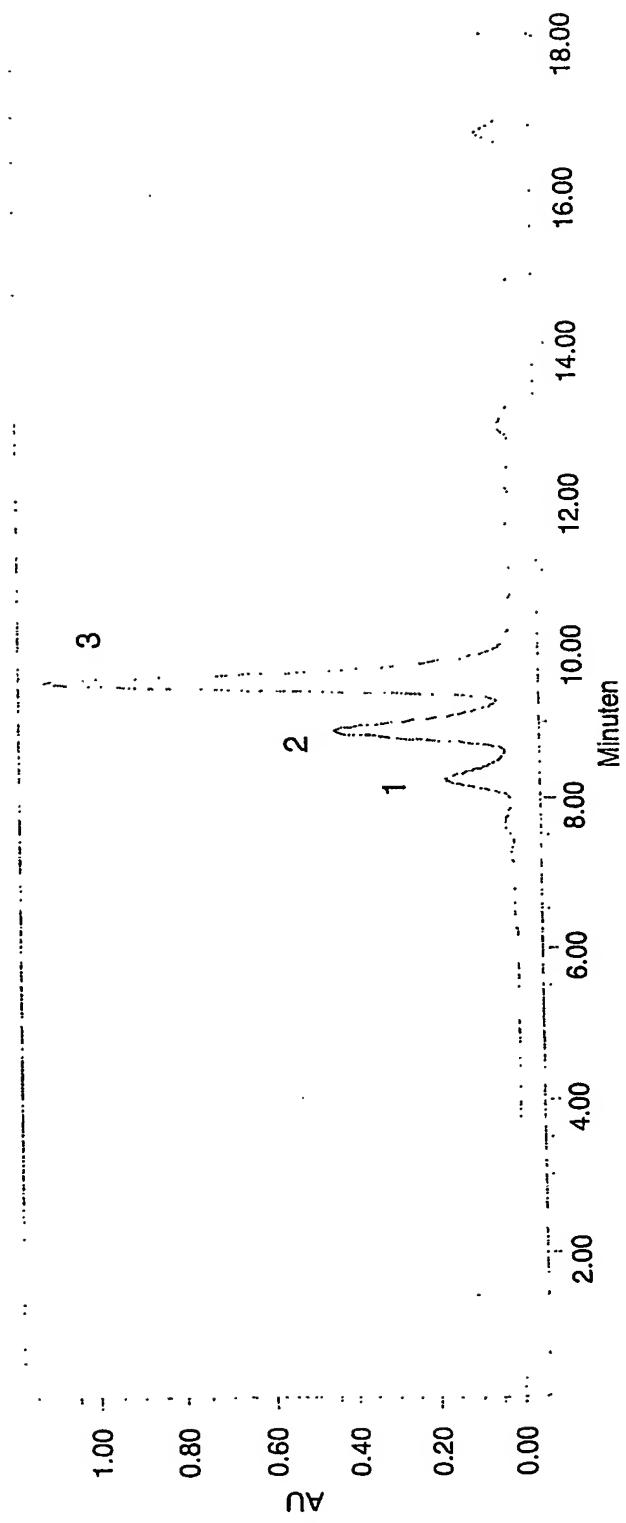


Abbildung 2



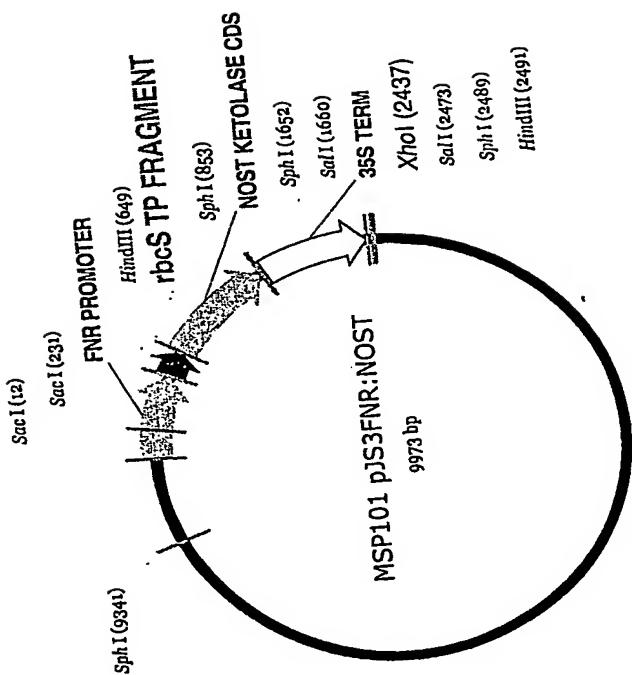


Abbildung 3

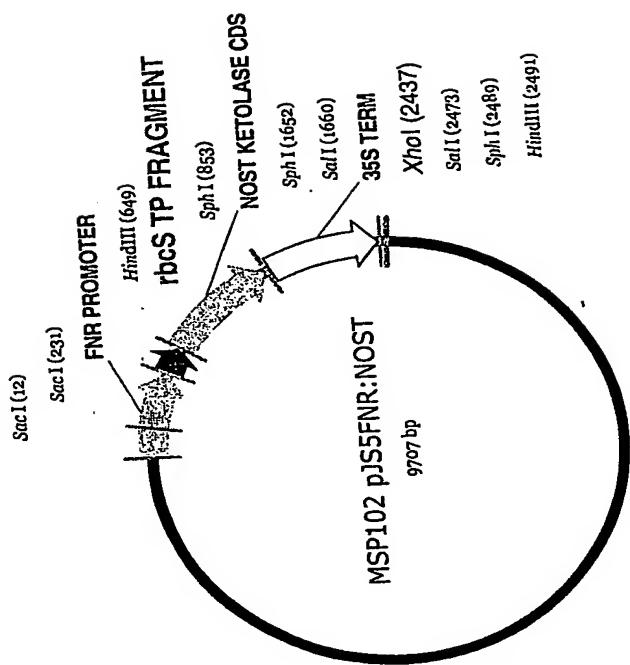


Abbildung 4

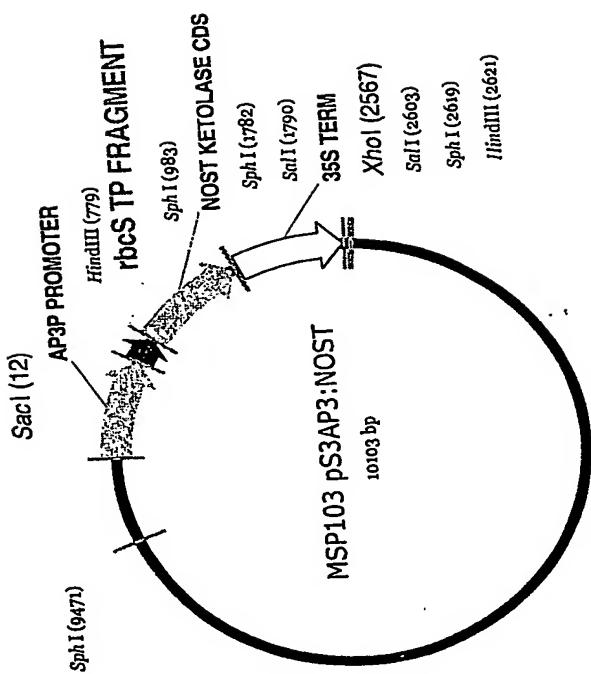


Abbildung 5

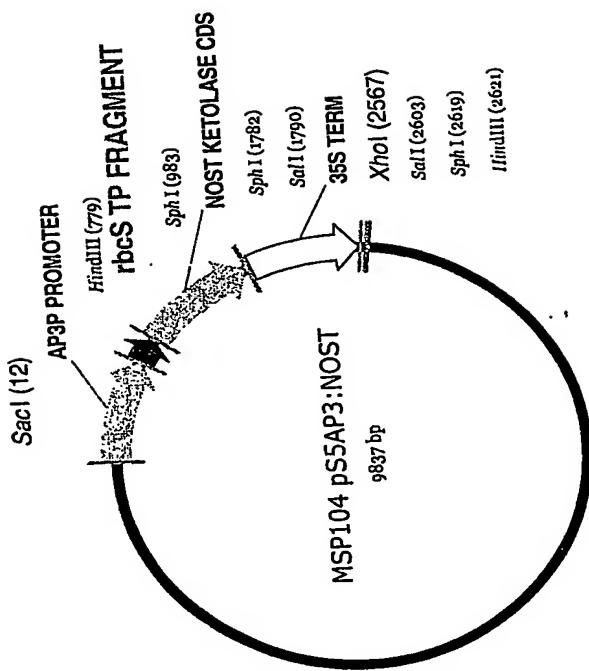
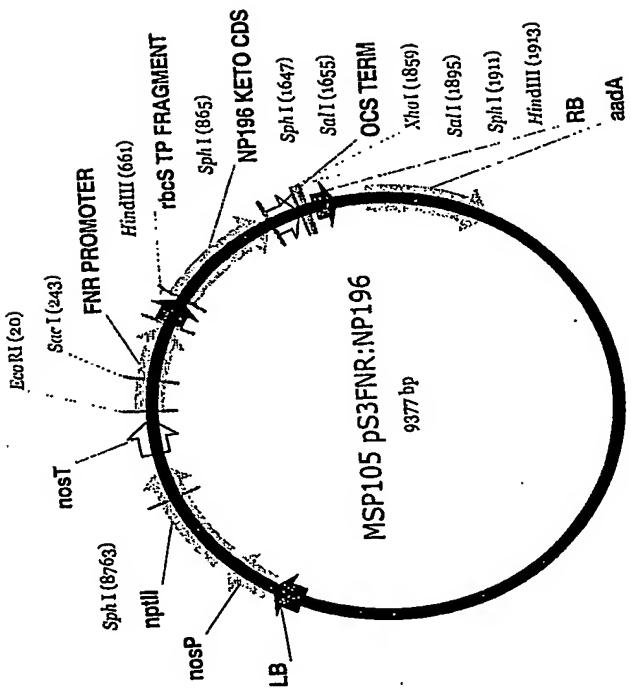


Abbildung 6



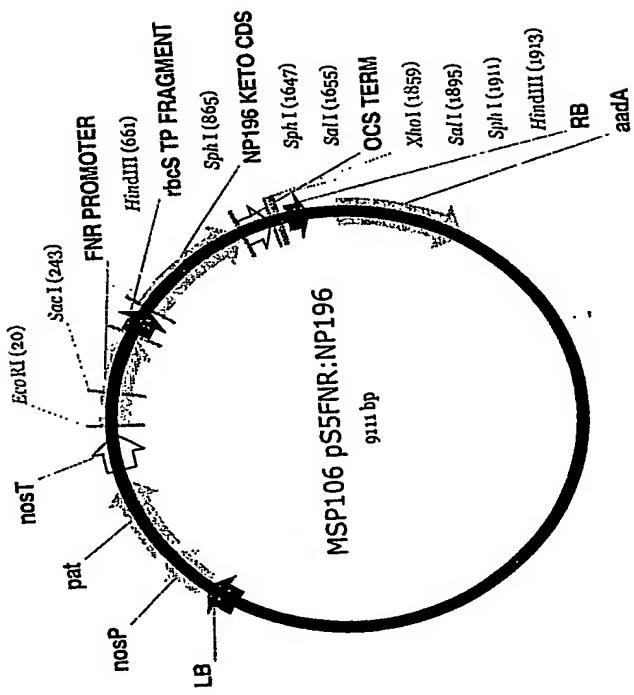
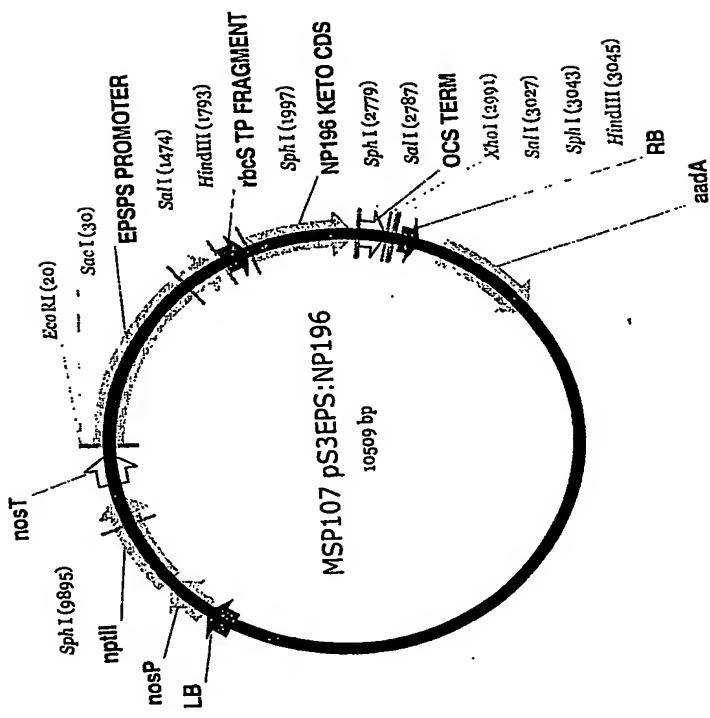
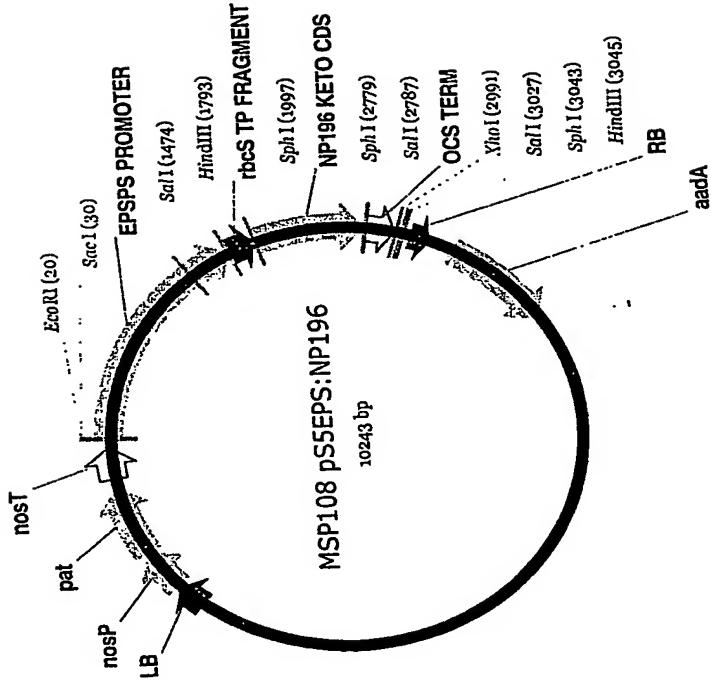
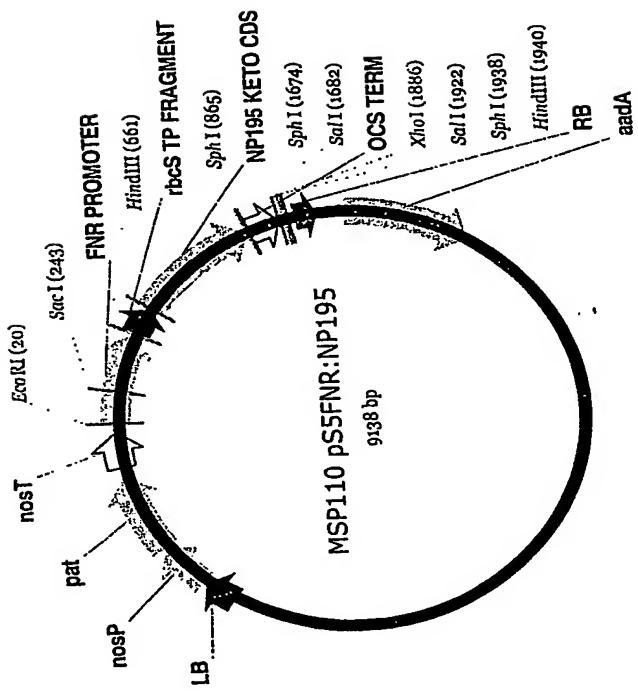


Abbildung 8









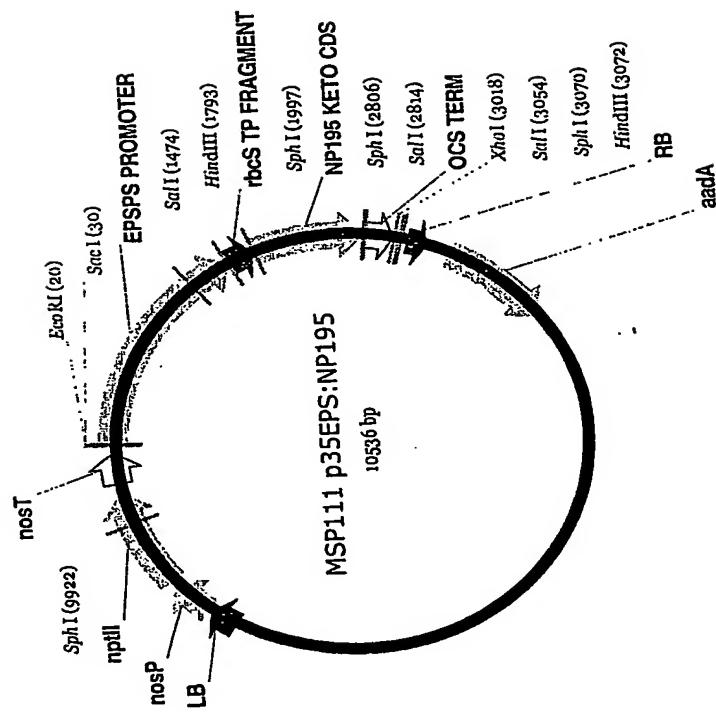
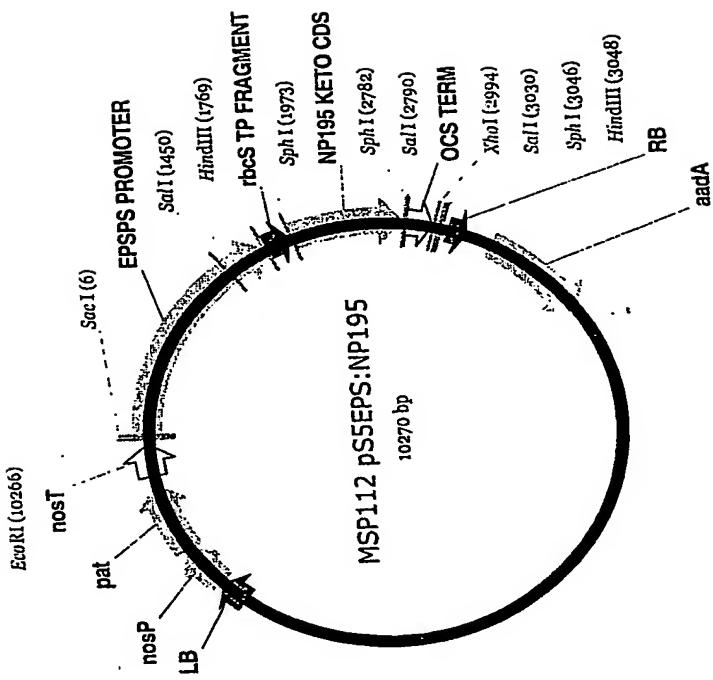
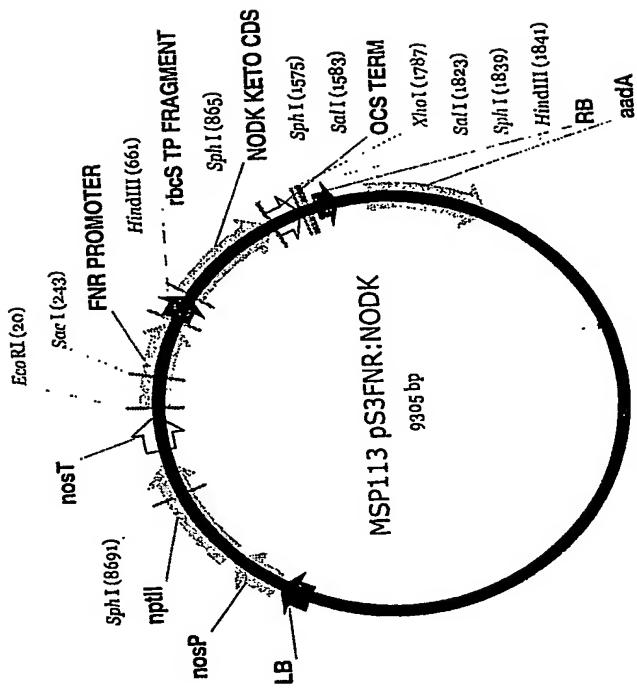
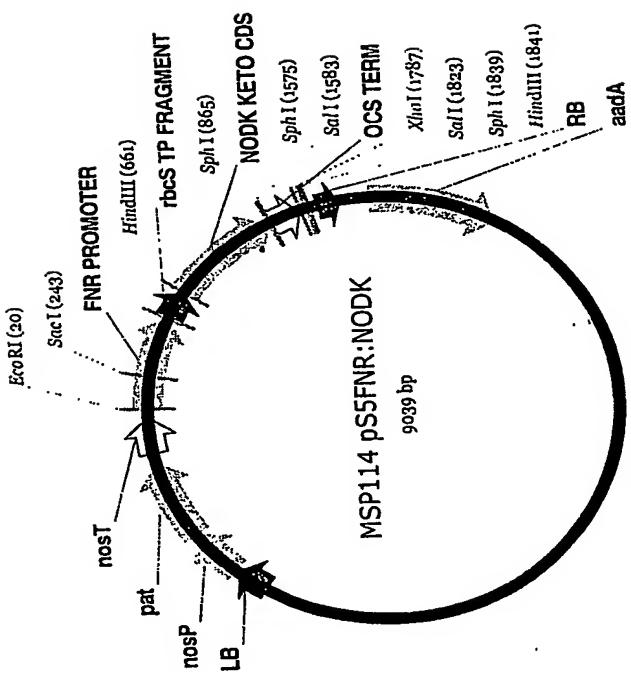


Abbildung 13







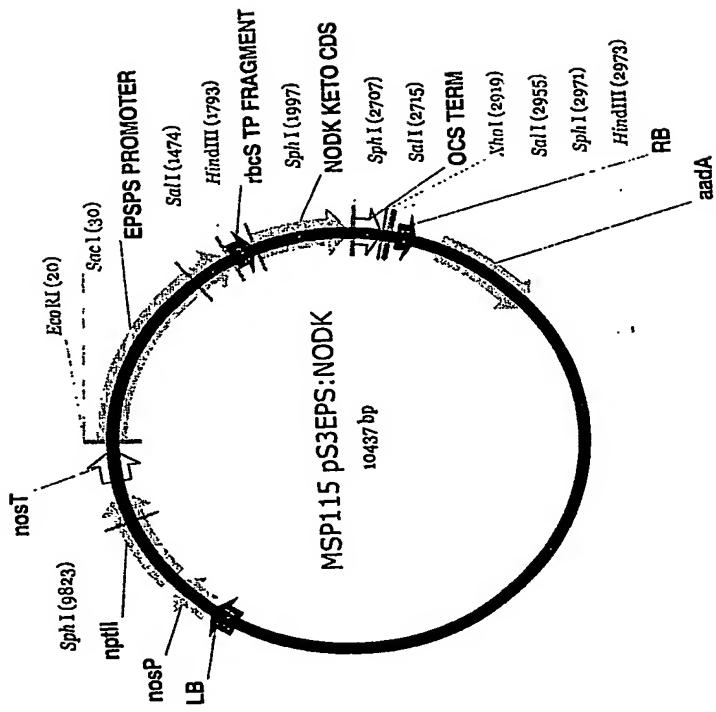
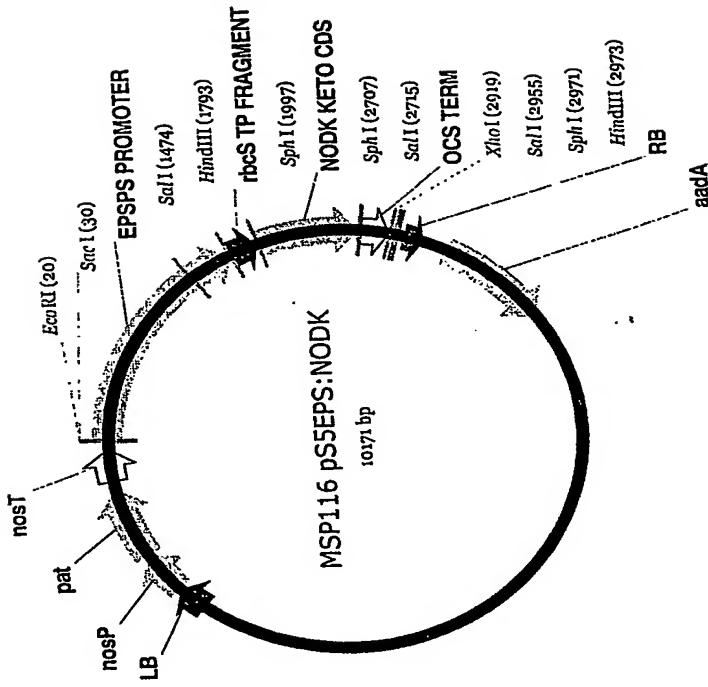


Abbildung 17



## SEQUENCE LISTING

5 &lt;110&gt; SunGene GmbH &amp; Co. KGaA

10 &lt;120&gt; Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch veränderten Organismen

15 &lt;130&gt; 20020636

20 &lt;160&gt; 74

25 &lt;170&gt; PatentIn version 3.1

30 &lt;210&gt; 1

35 &lt;211&gt; 777

40 &lt;212&gt; DNA

45 &lt;213&gt; Nostoc sp. Strain PCC7120

&lt;220&gt;

50 &lt;221&gt; CDS

55 &lt;222&gt; (1)...(777)

60 &lt;223&gt;

45	<400> 1 atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu 1               5               10               15	48
50	ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe 20               25               30	96
55	att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu 35               40               45	144
60	ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala 50               55               60	192
65	atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His 65               70               75               80	240
70	gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn 85               90               95	288

	ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys 100 105 110	336
5	gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp 115 120 125	384
10	tta gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp 130 135 140	432
15	tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly 145 150 155 160	480
20	tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu 165 170 175	528
25	caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly 195 200 205	624
30	ggt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe 210 215 220	672
35	tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His 225 230 235 240	720
40	gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct tac aaa ata Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile 245 250 255	768
45	tct tta taa Ser Leu	777
50	<210> 2 <211> 258 <212> PRT <213> Nostoc sp. Strain PCC7120	
55	<400> 2 Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu 1 5 10 15	
60	Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe 20 25 30	
65	Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu 35 40 45	
70	Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala	

50

55

60

5 Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 65 70 75 80

Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn  
 85 90 95

10

Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys  
 100 105 110

15

Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp  
 115 120 125

20

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp  
 130 135 140

25

Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly  
 145 150 155 160

30

Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu  
 165 170 175

35

Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val  
 180 185 190

40

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly  
 195 200 205

45

Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe  
 210 215 220

50

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His  
 225 230 235 240

55

Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile  
 245 250 255

Ser Leu

56

<210> 3

60

<211> 789

<212> DNA

65

<213> Nostoc punctiforme

70

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<223>

5	<400>	3			
10	ttg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln 1 5 10 15				48
15	tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val 20 25 30				96
20	att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn 35 40 45				144
25	tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln 50 55 60				192
30	atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His 65 70 75 80				240
35	ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser 85 90 95				288
40	cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys 100 105 110				336
45	aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp 115 120 125				384
50	ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe 130 135 140				432
55	atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu 145 150 155 160				480
60	ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile 165 170 175				528
65	tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr 180 185 190				576
70	tcc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr 195 200 205				624
75	ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile 210 215 220				672
80	gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240				720
85	gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn 245 250 255				768

789

aat tca gta acc aat tcg taa  
 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260

5

&lt;210&gt; 4

10 <211> 262  
 <212> PRT

&lt;213&gt; Nostoc punctiforme

15

&lt;400&gt; 4

20 Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15

25 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30

30 Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
 35 40 45

Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
 50 55 60

35 Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

40 Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
 85 90 95

45 Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
 100 105 110

50 Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp  
 115 120 125

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
 130 135 140

55 Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
 145 150 155 160

60 Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
 165 170 175

65 Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
 195 200 205

70

Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
 210 215 220

5 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

10 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
 245 250 255

15 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260

<210> 5

20 <211> 762

<212> DNA

25 <213> Nostoc punctiforme

<220>

30 <221> CDS

<222> (1)..(762)

35 <223>

<400> 5  
 gtg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca 48  
 Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
 1 5 10 15

40 gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc 96  
 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
 20 25 30

45 att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac 144  
 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp  
 35 40 45

50 atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa 192  
 Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60

55 aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat 240  
 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

60 ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca 288  
 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
 85 90 95

65 ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa 336  
 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110

aaa cat tgg tta cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat 384  
 Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp

70 115 120 125

	ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt	432
	Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe	
	130 135 140	
5	atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att	480
	Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile	
	145 150 155 160	
10	tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act	528
	Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr	
	165 170 175	
15	tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat	576
	Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr	
	180 185 190	
20	ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag	624
	Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Tyr Val Gln	
	195 200 205	
25	cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc	672
	Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile	
	210 215 220	
30	acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat	720
	Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His	
	225 230 235 240	
35	att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag	762
	Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys	
	245 250	
40	<210> 6	
	<211> 253	
45	<212> PRT	
	<213> Nostoc punctiforme	
50	<400> 6	
	Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro	
	1 5 10 15	
	Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val	
	20 25 30	
55	Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp	
	35 40 45	
60	Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln	
	50 55 60	
65	Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His	
	65 70 75 80	
70	Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr	
	85 90 95	

Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110

5

Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp  
 115 120 125

10

Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
 130 135 140

15

Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
 145 150 155 160

20

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
 165 170 175

25

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

30

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
 195 200 205

35

Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
 210 215 220

40

Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
 245 250

&lt;210&gt; 7

45 &lt;211&gt; 789

&lt;212&gt; DNA

50 &lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

55 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(789)

60 &lt;223&gt;

<400> 7  
 atg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa  
 Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15

48

tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta  
 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30

96

70

	att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn 35 40 45	144
5	tat gcc aaa att cat aag tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa Tyr Ala Lys Ile His Lys Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln 50 55 60	192
10	atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His 65 70 75 80	240
15	ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser 85 90 95	288
20	cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tatcaa cag atg tta aag Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys 100 105 110	336
25	aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp 115 120 125	384
	ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe 130 135 140	432
30	atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu 145 150 155 160	480
35	ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile 165 170 175	528
40	tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr 180 185 190	576
45	ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr 195 200 205	624
	ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile 210 215 220	672
50	gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240	720
55	gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn 245 250 255	768
60	aat tca gta acc aat tcg taa Asn Ser Val Thr Asn Ser 260	789
	<210> 8	
65	<211> 262	
	<212> PRT	
70	<213> Künstliche Sequenz	

&lt;400&gt; 8

5 Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15

10 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30

15 Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
 35 40 45

Tyr Ala Lys Ile His Lys Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
 50 55 60

20 Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

25 Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
 85 90 95

30 Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
 100 105 110

35 Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp  
 115 120 125

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
 130 135 140

40 Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
 145 150 155 160

45 Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
 165 170 175

50 Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

55 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
 195 200 205

Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
 210 215 220

60 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

65 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
 245 250 255

70 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260

<210>	9	
5	<211>	789
	<212>	DNA
10	<213>	Künstliche Sequenz
	<220>	
15	<221>	CDS
	<222>	(1)...(789)
20	<223>	
	<400>	9
25	atg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln 1 5 10 15	48
30	tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val 20 25 30	96
35	att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn 35 40 45	144
40	tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln 50 55 60	192
45	atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His 65 70 75 80	240
50	ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser 85 90 95	288
55	cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys 100 105 110	336
60	aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gat tta gac cca gat Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp 115 120 125	384
65	ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe 130 135 140	432
70	atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu 145 150 155 160	480
	ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile 165 170 175	528
	tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr 180 185 190	576

	ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat	624
	Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr	
5	195 200 205	
	ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc	672
	Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile	
	210 215 220	
10	gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat	720
	Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His	
	225 230 235 240	
15	gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac	768
	Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn	
	245 250 255	
20	aat tca gta acc aat tcg taa	789
	Asn Ser Val Thr Asn Ser	
	260	
25	<210> 10	
	<211> 262	
	<212> PRT	
30	<213> Künstliche Sequenz	
	<400> 10	
35	Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln	
	1 5 10 15	
40	Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val	
	20 25 30	
45	Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn	
	35 40 45	
	Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln	
	50 55 60	
50	Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His	
	65 70 75 80	
55	Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser	
	85 90 95	
60	Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys	
	100 105 110	
65	Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp	
	115 120 125	
	Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe	
	130 135 140	

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gin Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
 145 150 155 160

5 Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
 165 170 175

10 Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

15 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
 195 200 205

20 Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
 210 215 220

25 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

30 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
 245 250 255

Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 30 260

<210> 11

35 <211> 762

<212> DNA

40 <213> Künstliche Sequenz

<220>

45 <221> CDS

<222> (1)...(762)

50 <223>

<400> 11

55 atg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca  
 Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
 1 5 10 15

gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc  
 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
 60 20 25 30

att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac  
 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp  
 35 40 45

65 atc tca aag att cat aag tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa  
 Ile Ser Lys Ile His Lys Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60

70 aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat

	Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His		
65	65 70 75 80		
5	ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr	85 90 95	288
10	ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys	100 105 110	336
15	aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp	115 120 125	384
20	ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe	130 135 140	432
25	atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile	145 150 155 160	480
30	tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr	165 170 175	528
35	tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr	180 185 190	576
40	ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln	195 200 205	624
45	cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile	210 215 220	672
50	att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys	245 250	720
55	<210> 12		
	<211> 253		
	<212> PRT		
60	<213> Künstliche Sequenz		
65	<400> 12		
	Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro	1 5 10 15	
70	Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp	35 40 45	

Ile Ser Lys Ile His Lys Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60

5

Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

10

Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
 85 90 95

15

Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110

20

Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp  
 115 120 125

25

Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
 130 135 140

Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
 145 150 155 160

30

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
 165 170 175

35

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

40

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
 195 200 205

45

Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
 210 215 220

50

Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
 245 250

55

<210> 13

<211> 762

60

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

65

<220>

<221> CDS

70

<222> (1)...(762)

&lt;223&gt;

5	<400> 13 atg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro 1 5 10 15	48
10	gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val 20 25 30	96
15	att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp 35 40 45	144
20	atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln 50 55 60	192
25	aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His 65 70 75 80	240
30	ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr 85 90 95	288
35	ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys 100 105 110	336
40	aaa cat tgg tta cac cac aat cca gca agc gat tta gac ccg gat Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp 115 120 125	384
45	ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe 130 135 140	432
50	atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile 145 150 155 160	480
55	tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr 165 170 175	528
60	tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr 180 185 190	576
65	ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln 195 200 205	624
70	cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile 210 215 220	672
75	acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240	720
80	att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys 245 250	762

<210> 14  
 <211> 253  
 5 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
 10 <400> 14  
 Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
 1 5 10 15  
 15 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
 20 25 30  
 20 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp  
 35 40 45  
 25 Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60  
 30 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80  
 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
 85 90 95  
 35 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110  
 40 Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp  
 115 120 125  
 45 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
 130 135 140 145  
 50 Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
 145 150 155 160  
 Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
 165 170 175  
 55 Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190  
 60 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
 195 200 205  
 65 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
 210 215 220  
 70 Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys		
245	250	
5		
<210> 15		
10 <211> 1608		
10 <212> DNA		
15 <213> Haematococcus pluvialis		
20 <220>		
20 <221> CDS		
20 <222> (3)..(971)		
25 <223>		
30 <400> 15		
30 ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc		47
30 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile		
30 1 5 10 15		
35 ggc cca cct cct cat ctc cat cggt tca ttt gct gct acc acg atg ctg		95
35 Gly Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu		
35 20 25 30		
40 tcg aag ctg cag tca atc agc gtc aag gcc cgc gtt gaa cta gcc		143
40 Ser Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala		
40 35 40 45		
45 cgc gac atc acg cgg ccc aaa gtc tgc ctg cat gct cag cgg tgc tcg		191
45 Arg Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser		
45 50 55 60		
50 tta gtt cgg ctg cga gtg gca gca cca cag aca gag gag gcg ctg gga		239
50 Leu Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly		
50 65 70 75		
55 acc gtg cag gct gcc ggc gcg ggc gat gag cac agc gcc gat gta gca		287
55 Thr Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala		
55 80 85 90 95		
60 ctc cag cag ctt gac cgg gct atc gca gag cgt cgt gcc cgg cgc aaa		335
60 Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys		
60 100 105 110		
65 cgg gag cag ctg tca tac cag gct gcc gcc att gca gca tca att ggc		383
65 Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly		
65 115 120 125		
70 gtg tca ggc att gcc atc ttc gcc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac		431
70 Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His		
70 130 135 140		
75 atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc		479
75 Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu		
75 145 150 155		
80 ctc ttg gtg gtt ggt ggc gcg ctc ggc atg gag atg tat gcc cgc tat		527
80 Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr		
80 160 165 170 175		

	gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tcg cct ctg ggc tgg ctg ctg cac Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His 180 185 190	575
5	aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu 195 200 205	623
10	ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly 210 215 220	671
15	tcc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu 225 230 235	719
20	ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu 240 245 250 255	767
25	gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met 260 265 270	815
	aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly 275 280 285	863
30	ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile 290 295 300	911
35	cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp 305 310 315	959
40	tcc aag cgg tag ggtgcggAAC caggcacgct ggTTTcacac ctcatgcctg Ser Lys Arg 320	1011
	tgataagggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggctcg actggtctga	1071
45	tggccaatgg catcgccat gtctggcat cacgggctgg ttgcctgggt gaaggtgatg cacatcatca tgtgcggttg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc caggctggcg ttgaatcagt gagggtttgt gattggcggt tgtgaagcaa tgactccgcc	1131
50	catattctat ttgtggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcatt gatcatggta gtgcagcaaa ctatattcac ctaggcgtgt tgtaggatc aggtgaggcc ttgcacattg catgatgtac tcgtcatggt gtgttggta gaggatggat gtggatggat gtgtattctc	1191
55	agacgttagac cttgactgga ggcttgcattc agagagtggg ccgtatttt tgagagggga ggctcgtgcc agaaatggtg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcaggtgaga	1251
60	tgcactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1371
	<210> 16	1431
65	<211> 322	1491
	<212> PRT	1551
70	<213> Haematococcus pluvialis	1608

<400> 16

5 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly  
1 5 10 15

10 Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser  
20 25 30

15 Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg  
35 40 45

Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu  
50 55 60

20 Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr  
65 70 75 80

25 Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu  
85 90 95

30 Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg  
100 105 110

35 Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val  
115 120 125

40 Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met  
130 135 140

45 Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu  
145 150 155 160

50 Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala  
165 170 175

55 His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys  
180 185 190

Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe  
195 200 205

60 Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe  
210 215 220 225

65 Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly  
230 235 240

70 Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val  
245 250 255

His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys  
260 265 270

Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly  
 275 280 285  
 5

Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro  
 290 295 300

10 Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser.  
 305 310 315 320

15 Lys Arg

20 <210> 17  
 <211> 1650  
 <212> DNA

25 <213> Lycopersicon esculentum

30 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (112)..(1614)

35 <223>

40 <400> 17  
 ggcacgagga aacttttctc tcttcactag ctgtttacat gcttgaaatt tcaagatttt 60  
 aggaccccat ttgaagttt cttgaaaacaa atattaccct gttggaaaaa g atg gat 117  
 Met Asp  
 1

45 act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca cat cat 165  
 Thr Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro His His  
 5 10 15

50 ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat cat aat 213  
 Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His His Asn  
 20 25 30

55 ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt tgt gtt 261  
 Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val Cys Val  
 35 40 45 50

60 aag ggt agt agt gct ctt tta gag ctt gta cct gag acc aaa aag 309  
 Lys Gly Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr Lys Lys  
 55 60 65

65 gag aat ctt gat ttt gag ctt cct atg tat gac cct tca aaa ggg gtt 357  
 Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys Gly Val  
 70 75 80

70 gtt gtg gat ctt gct gtg gtt ggt ggc cct gca gga ctt gct gtt 405  
 Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Pro Ala Gly Leu Ala Val  
 85 90 95

70 gca cag caa gtt tct gaa gca gga ctc tct gtt tgt tca att gat ccg 453

	Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Léu Ser Val Cys Ser Ile Asp Pro		
	100 105 110		
5	aat cct aaa ttg ata tgg cct aat aac tat ggt gtt tgg gtg gat gaa Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu	115 120 125 130	501
10	ttt gag gct atg gac ttg tta gat tgt cta gat gct acc tgg tct ggt Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp Ser Gly	135 140 145	549
15	gca gca gtg tac att gat gat aat acg gct aaa gat ctt cat aga cct Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His Arg Pro	150 155 160	597
20	tat gga agg gtt aac cgg aaa cag ctg aaa tcg aaa atg atg cag aaa Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met Gln Lys	165 170 175	645
25	tgt ata atg aat ggt gtt aaa ttc cac caa gcc aaa gtt ata aag gtg Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile Lys Val	180 185 190	693
30	att cat gag gaa tcg aaa tcc atg ttg ata tgc aat gat ggt att act Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly Ile Thr	195 200 205 210	741
35	att cag gca acg gtg gtg ctc gat gca act ggc ttc tct aga tct ctt Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg Ser Leu	215 220 225	789
40	gtt cag tat gat aag cct tat aac ccc ggg tat caa gtt gct tat ggc Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala Tyr Gly	230 235 240	837
45	att ttg gct gaa gtg gaa gag cac ccc ttt gat gta aac aag atg gtt Ile Leu Ala Glu Val Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys Met Val	245 250 255	885
50	ttc atg gat tgg cga gat tct cat ttg aag aac aat act gat ctc aag Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp Leu Lys	260 265 270	933
55	gag aga aat agt aga ata cca act ttt ctt tat gca atg cca ttt tca Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe Ser	275 280 285 290	981
60	tcc aac agg ata ttt ctt gaa gaa aca tca ctc gta gct cgt cct ggc Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg Pro Gly	295 300 305	1029
65	ttg cgt ata gat gat att caa gaa cga atg gtg gct cgt tta aac cat Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu Asn His	310 315 320	1077
70	ttg ggg ata aaa gtg aag agc att gaa gaa gat gaa cat tgt cta ata Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys Leu Ile	325 330 335	1125
	cca atg ggt ggt cca ctt cca gta tta cct cag aga gtc gtt gga atc Pro Met Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val Gly Ile	340 345 350	1173
	ggt ggt aca gct ggc atg gtt cat cca tcc acc ggt tat atg gtg gca Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala	355 360 365 370	1221
	agg aca cta gct gcg gct cct gtt gtt gcc aat gcc ata att caa tac Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile Gln Tyr	375 380 385	1269

	ctc ggt tct gaa aga agt cat tcg ggt aat gaa tta tcc aca gct gtt Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr Ala Val 390 395 400	1317
5	tgg aaa gat ttg tgg cct ata gag agg aga cgt caa aga gag ttc ttc Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Gln Arg Glu Phe Phe 405 410 415	1365
10	tgc ttc ggt atg gat att ctt ctg aag ctt gat tta cct gct aca aga Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala Thr Arg 420 425 430	1413
15	agg ttc ttt gat gca ttc ttt gac tta gaa cct cgt tat tgg cat ggc Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp His Gly 435 440 445 450	1461
20	ttc tta tcg tct cga ttg ttt cta cct gaa ctc ata gtt ttt ggg ctg Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe Gly Leu 455 460 465	1509
25	tct cta ttc tct cat gct tca aat act tct aga ttt gag ata atg aca Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile Met Thr 470 475 480	1557
	aag gga act gtt cca tta gta aat atg atc aac aat ttg tta cag gat Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu Gln Asp 485 490 495	1605
30	aaa gaa tga atccgagtaa ttccgaaatct tgtccaatct cgtgcc	1650
	Lys Glu 500	
35	<210> 18	
	<211> 500	
40	<212> PRT	
	<213> Lycopersicon esculentum	
45	<400> 18	
	Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro 1 5 10 15	
50	His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His 20 25 30	
55	His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val 35 40 45	
60	Cys Val Lys Gly Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr 50 55 60	
65	Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys 65 70 75 80	
	Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Pro Ala Gly Leu 85 90 95	

Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile  
 100 105 110

5 Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val  
 115 120 125

10 Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp  
 130 135 140

15 Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His  
 145 150 155 160

Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met  
 165 170 175

20 Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile  
 180 185 190

25 Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly  
 195 200 205

30 Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg  
 210 215 220

35 Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala  
 225 230 235 240

Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys  
 245 250 255

40 Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp  
 260 265 270

45 Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro  
 275 280 285

50 Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg  
 290 295 300

55 Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu  
 305 310 315 320

Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys  
 325 330 335

60 Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val  
 340 345 350

65 Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met  
 355 360 365

70 Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile  
 370 375 380

5 Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr  
 385 390 395 400

5 Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu  
 405 410 415

10 Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala  
 420 425 430

15 Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp  
 435 440 445

20 His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe  
 450 455 460

25 Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile  
 465 470 475 480

Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu  
 485 490 495

30 Gln Asp Lys Glu  
 500

35 <210> 19

<211> 33

<212> DNA

40 <213> Künstliche Sequenz

45 <220>

<221> primer\_bind

50 <222> (1)...(33)

<223>

55 <400> 19  
 gcatgctcta gacctataa agatattttg tga 33

60 <210> 20

<211> 33

<212> DNA

65 <213> Künstliche Sequenz

70 <220>

<221> primer\_bind  
 <222> (1)..(33)  
 5 <223>  
  
 10 <400> 20 gcatgcacatc agaaatggtt cagtgtcaac cat 33  
 <210> 21  
 15 <211> 805  
 <212> DNA  
 <213> Nostoc sp. Strain PCC7120  
 20  
  
 <220>  
 25 <221> variation  
 <222> (1)..(805)  
 <223>  
 30  
  
 35 <400> 21 gcatgcacatc agaaatggtt cagtgtcaac catcatctc gcattcagaa aaactggtgt 60  
 tattgtcatc gacaatcaga gatgataaaa atattaataa gggtatattt attgcctgct 120  
 ttatcttatt tttatggca attagtttaa tcttattact ctcaatagat acatccataa 180  
 40 ttcataagag cttatttagt atagccatgc tttggcagac cttcttatat acaggtttat 240  
 ttattactgc tcatgatgcc atgcacggcg tagtttatcc caaaaatccc agaataaata 300  
 atttatagg taagctcact ctaatcttgt atggactact cccttataaa gatttattga 360  
 45 aaaaacattg gttacaccac ggacatcctg gtactgattt agaccctgat tattacaatg 420  
 gtcatccccaa aacttcttt ctttggtatac tacattttat gaagtcttat tggcgatgga 480  
 50 cgcaaattttt cggatttagtg atgattttc atggacttaa aaatctggtg catataccag 540  
 aaaataattt aattatattt tggatgatac cttctatattt aagttcagta caactatttt 600  
 attttggtac attttgccct cataaaaagc tagaagggtgg ttatactaac ccccattgtg 660  
 55 cgcgcagttat cccattacct cttttttggt cttttgttac ttgttatcac ttcggctacc 720  
 acaaggaaca tcacgaatac cctcaacttc cttggtgaa attacctgaa gtcacaaaaa 780  
 60 tatctttata aggtcttagag catgc 805  
  
 <210> 22  
 65 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 70

```
<220>
5   <221> primer_bind
    <222> (1)..(24)
    <223>
10
15   <400> 22
      aggtaccgca cggctctgccatcc
20   <210> 23
    <211> 26
    <212> DNA
    <213> Künstliche Sequenz
25
30   <220>
    <221> primer_bind
    <222> (1)..(26)
    <223>
35
40   <400> 23
      aagcttgacc tgattatcag cacgg
45   <210> 24
    <211> 4624
    <212> DNA
    <213> Erwinia uredovora
50
55   <220>
    <221> CDS
    <222> (128)..(1267)
    <223>
60
65   <220>
    <221> CDS
    <222> (1288)..(2766)
    <223>
```

<220>

<221> CDS

5 <222> (2802)..(3689)

<223>

10 <220>

<221> iDNA

15 <222> (3631)..(4158)

<223>

20 <400> 24  
 gtcgacttgc agcagcgcat ggcgaaaatc cagacagccc ttcgtttggc agggggcacc 60  
 atggccgctg ccgatatcat tgagcagggtt atgtgcaccc gtcagcctgt cttaagtggg 120  
 25 agcggct atg caa ccg cat tat gat ctg att ctc gtg ggg gct gga ctc 169  
 Met Gln Pro His Tyr Asp Leu Ile Leu Val Gly Ala Gly Leu  
 1 5 10

30 gcg aat ggc ctt atc gcc ctg cgt ctt cag cag caa cct gat atg 217  
 Ala Asn Gly Leu Ile Ala Leu Arg Leu Gln Gln Gln Pro Asp Met  
 15 20 25 30

35 cgt att ttg ctt atc gac gcc gca ccc cag gcg ggc ggg aat cat acg 265  
 Arg Ile Leu Leu Ile Asp Ala Ala Pro Gln Ala Gly Gly Asn His Thr  
 35 40 45

40 tgg tca ttt cac cac gat gat ttg act gag agc caa cat cgt tgg ata 313  
 Trp Ser Phe His His Asp Asp Leu Thr Glu Ser Gln His Arg Trp Ile  
 50 55 60

45 gct ccg ctg gtg gtt cat cac tgg ccc gac tat cag gta cgc ttt ccc 361  
 Ala Pro Leu Val Val His His Trp Pro Asp Tyr Gln Val Arg Phe Pro  
 65 70 75

50 aca cgc cgt cgt aag ctg aac agc ggc tac ttt tgt att act tct cag 409  
 Thr Arg Arg Arg Lys Leu Asn Ser Gly Tyr Phe Cys Ile Thr Ser Gln  
 80 85 90

55 cgt ttc gct gag gtt tta cag cga cag ttt ggc ccg cac ttg tgg atg 457  
 Arg Phe Ala Glu Val Leu Gln Arg Gln Phe Gly Pro His Leu Trp Met  
 95 100 105 110

60 gat acc gcg gtc gca gag gtt aat gcg gaa tct gtt cgg ttg aaa aag 505  
 Asp Thr Ala Val Ala Glu Val Asn Ala Glu Ser Val Arg Leu Lys Lys  
 115 120 125

65 ggt cag gtt atc ggt gcc cgc gcg gtg att gac ggg cgg ggt tat gcg 553  
 Gly Gln Val Ile Gly Ala Arg Ala Val Ile Asp Gly Arg Gly Tyr Ala  
 130 135 140

70 gca aat tca gca ctg agc gtg ggc ttc cag gcg ttt att ggc cag gaa 601  
 Ala Asn Ser Ala Leu Ser Val Gly Phe Gln Ala Phe Ile Gly Gln Glu  
 145 150 155

75 tgg cga ttg agc cac ccg cat ggt tta tcg tct ccc att atc atg gat 649  
 Trp Arg Leu Ser His Pro His Gly Leu Ser Ser Pro Ile Ile Met Asp  
 160 165 170

70 gcc acg gtc gat cag caa aat ggt tat cgc ttc gtg tac agc ctg ccg 697

	Ala Thr Val Asp Gln Gln Asn Gly Tyr Arg Phe Val Tyr Ser Leu Pro					
175	180	185	190			
5	ctc tcg ccg acc aga ttg tta att gaa gac acg cac tat att gat aat Leu Ser Pro Thr Arg Leu Leu Ile Glu Asp Thr His Tyr Ile Asp Asn	195	200	205	745	
10	gcg aca tta gat cct gaa tgc gcg cgaa aat att tgc gac tat gcc Ala Thr Leu Asp Pro Glu Cys Ala Arg Gln Asn Ile Cys Asp Tyr Ala	210	215	220	793	
15	gcg caa cag ggt tgg cag ctt cag aca ctg ctg cga gaa gaa cag ggc Ala Gln Gln Gly Trp Gln Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Glu Gln Gly	225	230	235	841	
20	gcc tta ccc att act ctg tcg ggc aat gcc gac gca ttc tgg cag cag Ala Leu Pro Ile Thr Leu Ser Gly Asn Ala Asp Ala Phe Trp Gln Gln	240	245	250	889	
25	cgc ccc ctg gcc tgt agt gga tta cgt gcc ggt ctg ttc cat cct acc Arg Pro Leu Ala Cys Ser Gly Leu Arg Ala Gly Leu Phe His Pro Thr	255	260	265	270	937
30	acc ggc tat tca ctg ccg ctg gcg gtt gcc gtg gcc gac cgc ctg agt Thr Gly Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Asp Arg Leu Ser	275	280	285	985	
35	gca ctt gat gtc ttt acg tcg gcc tca att cac cat gcc att acg cat Ala Leu Asp Val Phe Thr Ser Ala Ser Ile His His Ala Ile Thr His	290	295	300	1033	
40	ttt gcc cgc gag cgc tgg cag cag cag ggc ttt ttc cgc atg ctg aat Phe Ala Arg Glu Arg Trp Gln Gln Gly Phe Phe Arg Met Leu Asn	305	310	315	1081	
45	cgc atg ctg ttt tta gcc gga ccc gcc gat tca cgc tgg cgg gtt atg Arg Met Leu Phe Leu Ala Gly Pro Ala Asp Ser Arg Trp Arg Val Met	320	325	330	1129	
50	cag cgt ttt tat ggt tta cct gaa gat tta att gcc cgt ttt tat gcg Gln Arg Phe Tyr Gly Leu Pro Glu Asp Leu Ile Ala Arg Phe Tyr Ala	335	340	345	350	1177
55	gga aaa ctc acg ctg acc gat cgg cta cgt att ctg agc ggc aag ccg Gly Lys Leu Thr Leu Thr Asp Arg Leu Arg Ile Leu Ser Gly Lys Pro	355	360	365	1225	
60	cct gtt ccg gta tta gca gca ttg caa gcc att atg acg act Pro Val Pro Val Leu Ala Ala Leu Gln Ala Ile Met Thr Thr	370	375	380	1267	
65	catcgtaaaa gagcgactac atg aaa cca act acg gta att ggt gca ggc ttc Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe	385	390		1320	
70	ggt ggc ctg gca ctg gca att cgt cta caa gct gcg ggg atc ccc gtc Gly Gly Leu Ala Leu Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val	395	400	405	1368	
75	tta ctg ctt gaa caa cgt gat aaa ccc ggc ggt cgg gct tat gtc tac Leu Leu Leu Glu Gln Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr	410	415	420	1416	
80	gag gat cag ggg ttt acc ttt gat gca ggc ccg acg gtt atc acc gat Glu Asp Gln Gly Phe Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp	425	430	435	1464	
85	ccc agt gcc att gaa gaa ctg ttt gca ctg gca gga aaa cag tta aaa Pro Ser Ala Ile Glu Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys	440	445	450	1512	

	gag tat gtc gaa ctg ctg ccg gtt acg ccg ttt tac cgc ctg tgt tgg Glu Tyr Val Glu Leu Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp 460 465 470	1560
5	gag tca ggg aag gtc ttt aat tac gat aac gat caa acc ccg ctc gaa Glu Ser Gly Lys Val Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu 475 480 485	1608
10	gcg cag att cag cag ttt aat ccc cgc gat gtc gaa ggt tat cgt cag Ala Gln Ile Gln Gln Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Gln 490 495 500	1656
15	ttt ctg gac tat tca cgc gcg gtg ttt aaa gaa ggc tat cta aag ctc Phe Leu Asp Tyr Ser Arg Ala Val Phe Lys Glu Gly Tyr Leu Lys Leu 505 510 515	1704
20	ggt act gtc cct ttt tta tcg ttc aga gac atg ctt cgc gcc gca cct Gly Thr Val Pro Phe Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Ala Pro 520 525 530 535	1752
25	caa ctg gcg aaa ctg cag gca tgg aga agc gtt tac agt aag gtt gcc Gln Leu Ala Lys Leu Gln Ala Trp Arg Ser Val Tyr Ser Lys Val Ala 540 545 550	1800
30	agt tac atc gaa gat gaa cat ctg cgc cag gcg ttt tct ttc cac tcg Ser Tyr Ile Glu Asp Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser 555 560 565	1848
35	ctg ttg gtg ggc ggc aat ccc ttc gcc acc tca tcc att tat acg ttg Leu Leu Val Gly Gly Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu 570 575 580	1896
40	ata cac gcg ctg gag cgt gag tgg ggc gtc tgg ttt ccg cgt ggc ggc Ile His Ala Leu Glu Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly 585 590 595	1944
45	acc ggc gca tta gtt cag ggg atg ata aag ctg ttt cag gat ctg ggt Thr Gly Ala Leu Val Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly 600 605 610 615	1992
50	ggc gaa gtc gtg tta aac gcc aga gtc agc cat atg gaa acg aca gga Gly Glu Val Val Leu Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly 620 625 630	2040
55	aac aag att gaa gcc gtg cat tta gag gac ggt cgc agg ttc ctg acg Asn Lys Ile Glu Ala Val His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr 635 640 645	2088
60	caa gcc gtc gcg tca aat gca gat gtg gtt cat acc tat cgc gac ctg Gln Ala Val Ala Ser Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu 650 655 660	2136
65	tta agc cag cac cct gcc gcg gtt aag cag tcc aac aaa ctg cag act Leu Ser Gln His Pro Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr 665 670 675	2184
70	aag cgc atg agt aac tct ctg ttt gtg ctc tat ttt ggt ttg aat cac Lys Arg Met Ser Asn Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His 680 685 690 695	2232
75	cat cat gat cag ctc gcg cat cac acg gtt tgt ttc ggc ccg cgt tac His His Asp Gln Leu Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr 700 705 710	2280
80	cgc gag ctg att gac gaa att ttt aat cat gat ggc ctc gca gag gac Arg Glu Leu Ile Asp Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp 715 720 725	2328
85	ttc tca ctt tat ctg cac gcg ccc tgt gtc acg gat tcg tca ctg gcg	2376

	Phe Ser Leu Tyr Leu His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala	
	730 735 740	
5	cct gaa ggt tgc ggc agt tac tat gtg ttg gcg ccg gtg ccg cat tta Pro Glu Gly Cys Gly Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu	2424
	745 750 755	
10	ggc acc gcg aac ctc gac tgg acg gtt gag ggg cca aaa cta cgc gac Gly Thr Ala Asn Leu Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp	2472
	760 765 770 775	
15	cgt att ttt gcg tac ctt gag cag cat tac atg cct ggc tta cgg agt Arg Ile Phe Ala Tyr Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser	2520
	780 785 790	
20	cag ctg gtc acg cac cgg atg ttt acg ccg ttt gat ttt cgc gac cag Gln Leu Val Thr His Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln	2568
	795 800 805	
25	ctt aat gcc tat cat ggc tca gcc ttt tct gtg gag ccc gtt ctt acc Leu Asn Ala Tyr His Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr	2616
	810 815 820	
30	cag agc gcc tgg ttt cgg ccg cat aac cgc gat aaa acc att act aat Gln Ser Ala Trp Phe Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn	2664
	825 830 835	
35	ctc tac ctg gtc ggc gca ggc acg cat ccc ggc gca ggc att cct ggc Leu Tyr Leu Val Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly	2712
	840 845 850 855	
40	gtc atc ggc tcg gca aaa gcg aca gca ggt ttg atg ctg gag gat ctg Val Ile Gly Ser Ala Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu	2760
	860 865 870	
45	att tga ataatccgtc gttactcaat catgcgggtcg aaacg atg gca gtt ggc Ile Met Ala Val Gly	2813
	875	
50	tcg aaa agt ttt gcg aca gcc tca aag tta ttt gat gca aaa acc cgg Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp Ala Lys Thr Arg	2861
	880 885 890	
55	ccg agc gta ctg atg ctc tac gcc tgg tgc cgc cat tgt gac gat gtt Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Ala Trp Cys Arg His Cys Asp Asp Val	2909
	895 900 905	
60	att gac gat cag acg ctg ggc ttt cag gcc cgg cag cct gcc tta caa Ile Asp Asp Gln Thr Leu Gly Phe Gln Ala Arg Gln Pro Ala Leu Gln	2957
	910 915 920	
65	acg ccc gaa caa cgt ctg atg caa ctt gag atg aaa acg cgc cag gcc Thr Pro Glu Gln Arg Leu Met Gln Leu Glu Met Lys Thr Arg Gln Ala	3005
	925 930 935 940	
70	tat gca gga tcg cag atg cac gaa ccg gcg ttt gcg gct ttt cag gaa Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala Ala Phe Gln Glu	3053
	945 950 955	
75	gtg gct atg gct cat gat atc gcc ccg gct tac gcg ttt gat cat ctg Val Ala Met Ala His Asp Ile Ala Pro Ala Tyr Ala Phe Asp His Leu	3101
	960 965 970	
80	gaa ggc ttc gcc atg gat gta cgc gaa gcg caa tac agc caa ctg gat Glu Gly Phe Ala Met Asp Val Arg Glu Ala Gln Tyr Ser Gln Leu Asp	3149
	975 980 985	
85	gat acg ctg cgc tat tgc tat cac gtt gca ggc gtt gtc ggc ttg atg Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val Val Gly Leu Met	3197
	990 995 1000	

	atg	gcg	caa	atc	atg	ggc	gtg	cgg	gat	aac	gcc	acg	ctg	gac	cgc	3242	
	Met	Ala	Gln	Ile	Met	Gly	Val	Arg	Asp	Asn	Ala	Thr	Leu	Asp	Arg		
5	1005				1010						1015						
	gcc	tgt	gac	ctt	ggg	ctg	gca	ttt	cag	ttg	acc	aat	att	gct	cgc	3287	
	Ala	Cys	Asp	Leu	Gly	Leu	Ala	Phe	Gln	Leu	Thr	Asn	Ile	Ala	Arg		
	1020				1025						1030						
10	gat	att	gtg	gac	gat	gcf	cat	gcf	ggc	cgc	tgt	tat	ctg	ccg	gca	3332	
	Asp	Ile	Val	Asp	Asp	Ala	His	Ala	Gly	Arg	Cys	Tyr	Leu	Pro	Ala		
	1035				1040						1045						
15	agc	tgg	ctg	gag	cat	gaa	ggt	ctg	aac	aaa	gag	aat	tat	gcf	gca	3377	
	Ser	Trp	Leu	Glu	His	Glu	Gly	Leu	Asn	Lys	Glu	Asn	Tyr	Ala	Ala		
	1050				1055						1060						
20	cct	gaa	aac	cgt	cag	gcf	ctg	agc	cgt	atc	gcc	cgt	cgt	ttg	gtg	3422	
	Pro	Glu	Asn	Arg	Gln	Ala	Leu	Ser	Arg	Ile	Ala	Arg	Arg	Leu	Val		
	1065				1070						1075						
25	cag	gaa	gca	gaa	cct	tac	tat	ttg	tct	gcc	aca	gcc	ggc	ctg	gca	3467	
	Gln	Glu	Ala	Glu	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Ala	Thr	Ala	Gly	Leu	Ala		
	1080				1085						1090						
30	ggg	ttg	ccc	ctg	cgt	tcc	gcc	tgg	gca	atc	gct	acg	gcf	aag	cag	3512	
	Gly	Leu	Pro	Leu	Arg	Ser	Ala	Trp	Ala	Ile	Ala	Thr	Ala	Lys	Gln		
	1095				1100						1105						
35	gtt	tac	cgf	aaa	ata	ggt	gtc	aaa	gtt	gaa	cag	gcc	ggt	cag	caa	3557	
	Val	Tyr	Arg	Lys	Ile	Gly	Val	Lys	Val	Glu	Gln	Ala	Gly	Gln	Gln		
	1110				1115						1120						
40	gcc	tgg	gat	cag	cgf	cag	tca	acg	acc	acg	ccc	gaa	aaa	tta	acg	✓ 3602	
	Ala	Trp	Asp	Gln	Arg	Gln	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Glu	Lys	Leu	Thr		
	1125				1130						1135						
45	ctg	ctg	ctg	gcc	gcc	tct	ggt	cag	gcc	ctt	act	tcc	cgg	atg	cgg	3647	
	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ser	Gly	Gln	Ala	Leu	Thr	Ser	Arg	Met	Arg		
	1140				1145						1150						
50	gct	cat	cct	ccc	cgc	cct	gcf	cat	ctc	tgg	cag	cgc	ccg	ctc		3689	
	Ala	His	Pro	Pro	Arg	Pro	Ala	His	Leu	Trp	Gln	Arg	Pro	Leu			
	1155				1160						1165						
55	tagcgccatg	tctttcccg	agcgatcgcc	gaagtttga	caggggcg	gcata	gag	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	3749	
	agccaaaaga	aacacaac	ctt	ttt	cccc	tgacggcg	tg	atgcata	acgg	tg	cgccat	at	tc	at	tc	3809	
60	acaaccgtt	gaggtagcc	ttgcgtgg	aa	ta	ta	g	ca	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	3869	
	ggccgtcg	caccataaaa	tagat	aa	ta	at	ca	ta	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	3929	
65	ggagcgcca	cattcctgt	ctgccc	agat	aa	at	ca	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	3989	
	ccacggcata	aagatcg	ttt	acttcaaa	ac	ttt	ac	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	4049	
	60	tgccaaatcac	ggtaacgaaa	acgatcaggg	cattccaaat	ccacaacata	atttctccgg	tagagacgtc	tggcagcagg	cttaaggat	caat	tttaac	agagatt	ac	tgatctggcg	4229	
	65	gcggaaagg	aaaaaggcgc	gccagaaagg	cgcgc	cagg	atcaga	agg	tc	gg	ttt	caga	gg	ttt	caga	4289	
	70	accacacgg	atggcgctt	acctgcac	ga	at	at	gt	tc	gg	at	gt	tc	gg	at	tc	4349
	atcggaa	atcggaa	actccactgt	cggcgaata	tctgtac	ggc	cag	cc	cag	tt	cag	cgt	gaa	cag	gt	4409	
	cgcagctgcg	caggtaacc	ggttgaagaa	cccgtcac	gg	ccgtc	ac	gg	ccgtc	gg	ccgtc	gg	ccgtc	gg	ccgtc	gg	4469

ctgaaagccg ggcacgtcaa acggcttcag tacggcaccc acggtatgga acttaccgcg 4529  
 aggccagg gcccggaaagt agggttgccca gtcgagatcg acggcgaccg tgctgataat 4589  
 caggtcaaac tggcccgcca ggcttttaa agctt 4624  
  
 5 <210> 25  
 10 <211> 380  
 <212> PRT  
 15 <213> Erwinia uredovora  
  
 20 <400> 25  
 Met Gln Pro His Tyr Asp Leu Ile Leu Val Gly Ala Gly Leu Ala Asn  
 1 5 10 15  
  
 25 Gly Leu Ile Ala Leu Arg Leu Gln Gln Gln Pro Asp Met Arg Ile  
 20 25 30  
  
 30 Leu Leu Ile Asp Ala Ala Pro Gln Ala Gly Gly Asn His Thr Trp Ser  
 35 40 45  
  
 35 Phe His His Asp Asp Leu Thr Glu Ser Gln His Arg Trp Ile Ala Pro  
 50 55 60  
  
 40 Leu Val Val His His Trp Pro Asp Tyr Gln Val Arg Phe Pro Thr Arg  
 65 70 75 80  
  
 45 Arg Arg Lys Leu Asn Ser Gly Tyr Phe Cys Ile Thr Ser Gln Arg Phe  
 85 90 95  
  
 50 Ala Glu Val Leu Gln Arg Gln Phe Gly Pro His Leu Trp Met Asp Thr  
 100 105 110  
  
 55 Ala Val Ala Glu Val Asn Ala Glu Ser Val Arg Leu Lys Lys Gly Gln  
 115 120 125  
  
 60 Val Ile Gly Ala Arg Ala Val Ile Asp Gly Arg Gly Tyr Ala Ala Asn  
 130 135 140  
  
 65 Ser Ala Leu Ser Val Gly Phe Gln Ala Phe Ile Gly Gln Glu Trp Arg  
 145 150 155 160  
  
 70 Leu Ser His Pro His Gly Leu Ser Ser Pro Ile Ile Met Asp Ala Thr  
 165 170 175  
  
 75 Val Asp Gln Gln Asn Gly Tyr Arg Phe Val Tyr Ser Leu Pro Leu Ser  
 180 185 190  
  
 80 Pro Thr Arg Leu Leu Ile Glu Asp Thr His Tyr Ile Asp Asn Ala Thr  
 195 200

Leu Asp Pro Glu Cys Ala Arg Gln Asn Ile Cys Asp Tyr Ala Ala Gln  
 210 215 220

5

Gln Gly Trp Gln Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Glu Gln Gly Ala Leu  
 225 230 235 240

10

Pro Ile Thr Leu Ser Gly Asn Ala Asp Ala Phe Trp Gln Gln Arg Pro  
 245 250 255

15

Leu Ala Cys Ser Gly Leu Arg Ala Gly Leu Phe His Pro Thr Thr Gly  
 260 265 270

20

Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Asp Arg Leu Ser Ala Leu  
 275 280 285

25

Asp Val Phe Thr Ser Ala Ser Ile His His Ala Ile Thr His Phe Ala  
 290 295 300

30

Arg Glu Arg Trp Gln Gln Gly Phe Phe Arg Met Leu Asn Arg Met  
 305 310 315 320

35

Leu Phe Leu Ala Gly Pro Ala Asp Ser Arg Trp Arg Val Met Gln Arg  
 325 330 335

40

Phe Tyr Gly Leu Pro Glu Asp Leu Ile Ala Arg Phe Tyr Ala Gly Lys  
 340 345 350

45

Leu Thr Leu Thr Asp Arg Leu Arg Ile Leu Ser Gly Lys Pro Pro Val  
 355 360 365

Pro Val Leu Ala Ala Leu Gln Ala Ile Met Thr Thr  
 370 375 380

50

<210> 26

<211> 492

<212> PRT

55

<213> Erwinia uredovora

60

<400> 26

Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu  
 1 5 10 15

65

Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Glu Gln  
 20 25 30

70

Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu Asp Gln Gly Phe  
 35 40 45

Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Ser Ala Ile Glu  
 50 55 60

5 Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys Glu Tyr Val Glu Leu  
 65 70 75 80

10 Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly Lys Val  
 85 90 95

15 Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu Ala Gln Ile Gln Gln  
 100 105 110

20 Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Ser  
 115 120 125

25 Arg Ala Val Phe Lys Glu Gly Tyr Leu Lys Leu Gly Thr Val Pro Phe  
 130 135 140

30 Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Ala Pro Gln Leu Ala Lys Leu  
 145 150 155 160

35 Gln Ala Trp Arg Ser Val Tyr Ser Lys Val Ala Ser Tyr Ile Glu Asp  
 165 170 175

40 Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu Leu Val Gly Gly  
 180 185 190

45 Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile His Ala Leu Glu  
 195 200 205

50 Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly Thr Gly Ala Leu Val  
 210 215 220

55 Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly Gly Glu Val Val Leu  
 225 230 235 240

60 Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly Asn Lys Ile Glu Ala  
 245 250 255

65 Val His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr Gln Ala Val Ala Ser  
 260 265 270

70 Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Ser Gln His Pro  
 275 280 285

75 Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr Lys Arg Met Ser Asn  
 290 295 300

80 Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His His His Asp Gln Leu  
 305 310 315 320

85 Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp

36

325

330

335

5 Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Leu  
           340               345               350

His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly Cys Gly  
355 360 365

10 .  
Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Thr Ala Asn Leu  
370 375 380

15 Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Ala Tyr  
 385 390 395 400

Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln Leu Asn Ala Tyr His  
420 425 430

Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Ala Trp Phe  
435 440 445

30 Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn Leu Tyr Leu Val Gly  
                  455                                460

35 Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Ile Gly Ser Ala  
465 470 475 . . 480

40 Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile  
485 490

<210> 27

45

<212> PRT

50 <213> Erwinia uredovora

<400> 27

55 Met Ala Val Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp  
           1                 5                 10                 15

60 Ala Lys Thr Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Ala Trp Cys Arg His  
20 25 30

Cys Asp Asp Val Ile Asp Asp Gln Thr Leu Gly Phe Gln Ala Arg Gln

pro Ala Leu Gln Thr Pro Glu Gln Arg Leu Met Gln Leu Glu Met Lys

50 55 60

Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala  
 65 70 75 80

5 Ala Phe Gln Glu Val Ala Met Ala His Asp Ile Ala Pro Ala Tyr Ala  
 85 90 95

10 Phe Asp His Leu Glu Gly Phe Ala Met Asp Val Arg Glu Ala Gln Tyr  
 100 105 110

15 Ser Gln Leu Asp Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val  
 115 120 125

20 Val Gly Leu Met Met Ala Gln Ile Met Gly Val Arg Asp Asn Ala Thr  
 130 135 140

Leu Asp Arg Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile  
 145 150 155 160

25 Ala Arg Asp Ile Val Asp Asp Ala His Ala Gly Arg Cys Tyr Leu Pro  
 165 170 175

30 Ala Ser Trp Leu Glu His Glu Gly Leu Asn Lys Glu Asn Tyr Ala Ala  
 180 185 190

35 Pro Glu Asn Arg Gln Ala Leu Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Val Gln  
 195 200 205

40 Glu Ala Glu Pro Tyr Tyr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Leu Ala Gly Leu  
 210 215 220

Pro Leu Arg Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln Val Tyr Arg  
 225 230 235 240

45 Lys Ile Gly Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Gln Gln Ala Trp Asp Gln  
 245 250 255

50 Arg Gln Ser Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ala  
 260 265 270

55 Ser Gly Gln Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg Ala His Pro Pro Arg Pro  
 275 280 285

Ala His Leu Trp Gln Arg Pro Leu  
 290 295

60 <210> 28

65 <211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>  
 5 <221> primer\_bind  
 <222> (1)..(32)  
 <223>  
 10  
 <400> 28  
 ttttctcga gcgataaacg ctcacttggt ta 32  
 15  
 <210> 29  
 <211> 32  
 20 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 25  
 <220>  
 <221> primer\_bind  
 30 <222> (1)..(32)  
 <223>  
 35  
 <400> 29  
 ttttgcaga cacgttatgc tcacaacccc gg 32  
 40 <210> 30  
 <211> 679  
 45 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 50  
 <220>  
 <221> CDS  
 55 <222> (87)..(635)  
 <223>  
 60  
 <400> 30  
 ctcgagcgat aaacgctcac ttggtaatc attcactct tcaattatct ataatgatga 60  
 gtgatcagaa ttacatgtga gaaatt atg caa acg gaa cac gtc att tta ttg 113  
 65 Met Gln Thr Glu His Val Ile Leu Leu  
 1 5  
 aat gca cag gga gtt ccc acg ggt acg ctg gaa aag tat gcc gca cac 161  
 Asn Ala Gln Gly Val Pro Thr Gly Thr Leu Glu Lys Tyr Ala Ala His  
 70 10 15 20 25

acg gca gac acc cgc tta cat ctc gcg ttc tcc agt tgg ctg ttt aat Thr Ala Asp Thr Arg Leu His Leu Ala Phe Ser Ser Trp Leu Phe Asn 30 35 40	209
5 gcc aaa gga caa tta tta gtt acc cgc cgc gca ctg agc aaa aaa gca Ala Lys Gly Gln Leu Leu Val Thr Arg Arg Ala Leu Ser Lys Lys Ala 45 50 55	257
10 tgg cct ggc gtg tgg act aac tcg gtt tgt ggg cac cca caa ctg gga Trp Pro Gly Val Trp Thr Asn Ser Val Cys Gly His Pro Gln Leu Gly 60 65 70	305
15 gaa agc aac gaa gac gca gtg atc cgc cgt tgc cgt tat gag ctt ggc Glu Ser Asn Glu Asp Ala Val Ile Arg Arg Cys Arg Tyr Glu Leu Gly 75 80 85	353
20 gtg gaa att acg cct cct gaa tct atc tat cct gac ttt cgc tac cgc Val Glu Ile Thr Pro Pro Glu Ser Ile Tyr Pro Asp Phe Arg Tyr Arg 90 95 100 105	401
25 gcc acc gat ccg agt ggc att gtg gaa aat gaa gtg tgt ccg gta ttt Ala Thr Asp Pro Ser Gly Ile Val Glu Asn Glu Val Cys Pro Val Phe 110 115 120	449
30 gcc gca cgc acc act agt gcg tta cag atc aat gat gat gaa gtg atg Ala Ala Arg Thr Thr Ser Ala Leu Gln Ile Asn Asp Asp Glu Val Met 125 130 135	497
35 gat tat caa tgg tgt gat tta gca gat gta tta cac ggt att gat gcc Asp Tyr Gln Trp Cys Asp Leu Ala Asp Val Leu His Gly Ile Asp Ala 140 145 150	545
40 gaa gcc aga aaa cga tta tct gca ttt acc cag ctt aaa taa Glu Ala Arg Lys Arg Leu Ser Ala Phe Thr Gln Leu Lys 170 175 180	635
45 aaaaaccccg acatttgcgg gggttgtgag cataacgtgt cgac	679
50 <210> 31	
55 <211> 182	
50 <212> PRT	
55 <213> Escherichia coli	
60 <400> 31	
65 Met Gln Thr Glu His Val Ile Leu Leu Asn Ala Gln Gly Val Pro Thr 1 5 10 15	
Gly Thr Leu Glu Lys Tyr Ala Ala His Thr Ala Asp Thr Arg Leu His 20 25 30	
70 Leu Ala Phe Ser Ser Trp Leu Phe Asn Ala Lys Gly Gln Leu Leu Val 35 40 45	
70 Thr Arg Arg Ala Leu Ser Lys Lys Ala Trp Pro Gly Val Trp Thr Asn	

40

50

55

60

5 Ser Val Cys Gly His Pro Gln Leu Gly Glu Ser Asn Glu Asp Ala Val  
 65 70 75 80

10 Ile Arg Arg Cys Arg Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ile Thr Pro Pro Glu  
 10 85 90 95

15 Ser Ile Tyr Pro Asp Phe Arg Tyr Arg Ala Thr Asp Pro Ser Gly Ile  
 100 105 110

20 Val Glu Asn Glu Val Cys Pro Val Phe Ala Ala Arg Thr Thr Ser Ala  
 115 120 125

25 Leu Gln Ile Asn Asp Asp Glu Val Met Asp Tyr Gln Trp Cys Asp Leu  
 130 135 140

30 Ala Asp Val Leu His Gly Ile Asp Ala Thr Pro Trp Ala Phe Ser Pro  
 145 150 155 160

35 Trp Met Val Met Gln Ala Thr Asn Arg Glu Ala Arg Lys Arg Leu Ser  
 165 170 175

40 Ala Phe Thr Gln Leu Lys  
 180

45 <210> 32

50 <211> 31

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

55 <220>

60 <221> primer\_bind

65 <222> (1)..(31)

<223>

70 <400> 32

tttttccatg gtgaaggagg aaatagcgaa a

31

<210> 33 .

<211> 32

65 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

70

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

5 &lt;222&gt; (1)..(32)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 33.

ttttaagct ttcactttt tcttgtaacc aa

32

15 &lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 962

20 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Archaeoglobus fulgidus

25 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

30 &lt;222&gt; (3)..(956)

&lt;223&gt;

35 &lt;400&gt; 34

cc atg gtg aag gag gaa ata gcg aaa agg gcc gaa ata atc aac aaa  
Met Val Lys Glu Glu Ile Ala Lys Arg Ala Glu Ile Ile Asn Lys  
1 5 10 15

47

40 gcc att gaa gag ctt ctg ccc gaa agg gag ccg att gga ctc tac aaa  
Ala Ile Glu Glu Leu Leu Pro Glu Arg Glu Pro Ile Gly Leu Tyr Lys  
20 25 30

95

45 gcc gca agg cat ctg atc aaa gca ggt ggc aag agg cta agg cct gta  
Ala Ala Arg His Leu Ile Lys Ala Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Val  
35 40 45

143

50 ata agc ctc tta gca gtc gaa gcc ctt ggg aaa gac tac aga aag att  
Ile Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly Lys Asp Tyr Arg Lys Ile  
50 55 60

191

55 atc ccg gct gtc agc att gaa aca atc cac aac ttc acc ctc gtg  
Ile Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile His Asn Phe Thr Leu Val  
65 70 75

239

cat gac gac ata atg gac agg gac gag atg agg agg gga gtt ccg acg  
His Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met Arg Arg Gly Val Pro Thr  
80 85 90 95

287

60 gta cac agg gtt tat ggg gaa gcg acg gcc att tta gca ggc gac aca  
Val His Arg Val Tyr Gly Glu Ala Thr Ala Ile Leu Ala Gly Asp Thr  
100 105 110

335

65 ctc ttt gct gaa gcc ttc aag ctg ctg aca aag tgc gat gtt gag agc  
Leu Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr Lys Cys Asp Val Glu Ser  
115 120 125

383

70 gag gga atc aga aaa gct aca gaa atg ctt tcg gac gtt tgc ata aaa  
Glu Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu Ser Asp Val Cys Ile Lys  
130 135 140

431

	ata tgc gag ggg cag tac tac gac atg agc ttt gag aaa aag gag agc Ile Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser Phe Glu Lys Lys Glu Ser 145 150 155	479
5	gtt tcc gag gag gag tat ctc agg atg gtc gag ctg aag acc gga gtg Val Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val Glu Leu Lys Thr Gly Val 160 165 170 175	527
10	ctg att gca gct tct gca gca tta cct gcg gtg ctt ttt ggg gag agc Leu Ile Ala Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ala Val Leu Phe Gly Glu Ser 180 185 190	575
15	gag gaa att gta aag gcg ctg tgg gac tac gga gtt ctt agc ggt att Glu Glu Ile Val Lys Ala Leu Trp Asp Tyr Gly Val Leu Ser Gly Ile 195 200 205	623
20	ggc ttc cag atc cag gac gac ctg ctt gac ctg act gag gag acc gga Gly Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu Leu Asp Leu Thr Glu Glu Thr Gly 210 215 220	671
25	aag gac tgg gga agc gac ctg ctt aaa ggg aag aaa acc ctg att gtc Lys Asp Trp Gly Ser Asp Leu Leu Lys Gly Lys Lys Thr Leu Ile Val 225 230 235	719
30	ata aag gcg ttc gaa aag gga gtg aag cta aag acg ttt gga aag gaa Ile Lys Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Leu Lys Thr Phe Gly Lys Glu 240 245 250 255	767
35	aag gcg gac gtc tct gag att aga gat gat atc gaa aag tta aga gag Lys Ala Asp Val Ser Glu Ile Arg Asp Asp Ile Glu Lys Leu Arg Glu 260 265 270	815
40	tgt ggt gcg att gat tac gct gcc agc atg gca aga aag atg gct gaa Cys Gly Ala Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Met Ala Arg Lys Met Ala Glu 275 280 285	863
45	gag gcg aaa aga aag ctc gaa gtt ctg cct gaa agc aaa gcc aag gaa Glu Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro Glu Ser Lys Ala Lys Glu 290 295 300	911
50	aca ctg ctg gaa ctt acc gac ttc ttg gtt aca aga aaa aag tga Thr Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val Thr Arg Lys Lys Lys 305 310 315	956
55	aagctt	962
60	<210> 35	
	<211> 317	
	<212> PRT	
65	<213> Archaeoglobus fulgidus	
70	<400> 35	
	Met Val Lys Glu Glu Ile Ala Lys Arg Ala Glu Ile Ile Asn Lys Ala 1 5 10 15	
	Ile Glu Glu Leu Leu Pro Glu Arg Glu Pro Ile Gly Leu Tyr Lys Ala 20 25 30	
	Ala Arg His Leu Ile Lys Ala Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Val Ile 35 40 45	

Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly Lys Asp Tyr Arg Lys Ile Ile  
 50 55 60

5 Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile His Asn Phe Thr Leu Val His  
 65 70 75 80

10 Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met Arg Arg Gly Val Pro Thr Val  
 85 90 95

15 His Arg Val Tyr Gly Glu Ala Thr Ala Ile Leu Ala Gly Asp Thr Leu  
 100 105 110

20 Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr Lys Cys Asp Val Glu Ser Glu  
 115 120 125

25 Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu Ser Asp Val Cys Ile Lys Ile  
 130 135 140

30 Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser Phe Glu Lys Lys Glu Ser Val  
 145 150 155 160

35 Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val Glu Leu Lys Thr Gly Val Leu  
 165 170 175

40 Ile Ala Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ala Val Leu Phe Gly Glu Ser Glu  
 180 185 190

45 Glu Ile Val Lys Ala Leu Trp Asp Tyr Gly Val Leu Ser Gly Ile Gly  
 195 200 205

50 Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu Leu Asp Leu Thr Glu Glu Thr Gly Lys  
 210 215 220

55 Asp Trp Gly Ser Asp Leu Leu Lys Gly Lys Lys Thr Leu Ile Val Ile  
 225 230 235 240

60 Lys Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Leu Lys Thr Phe Gly Lys Glu Lys  
 245 250 255

65 Ala Asp Val Ser Glu Ile Arg Asp Asp Ile Glu Lys Leu Arg Glu Cys  
 260 265 270

70 Gly Ala Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Met Ala Arg Lys Met Ala Glu Glu  
 275 280 285

Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro Glu Ser Lys Ala Lys Glu Thr  
 290 295 300

75 Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val Thr Arg Lys Lys  
 305 310 315

<210> 36  
 <211> 1293  
 5 <212> DNA  
 <213> Archaeoglobus fulgidus

10 <220>  
 <221> CDS  
 15 <222> (206)..(1159)  
 <223>

20 <400> 36  
 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtataa cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg 60  
 gccccccctc gacgccgtcg ttcaatgaga atggataaga ggctcggtgg attgacgtga 120  
 25 gggggcaggg atggctatat ttctgggagc gaactccggg cgaggatcta gttgttaggga 180  
 gggattcatg acaccacaaa cagcc atg gtg aag gag gaa ata gcg aaa agg 232  
 Met Val Lys Glu Ile Ala Lys Arg  
 30 1 5

gcc	gaa	ata	atc	aac	aaa	gcc	att	gaa	gag	ctt	ctg	ccc	gaa	agg	gag	280
Ala	Glu	Ile	Ile	Asn	Lys	Ala	Ile	Glu	Glu	Leu	Leu	Pro	Glu	Arg	Glu	
10						15				20					25	

35 ccg att gga ctc tac aaa gcc gca agg cat ctg atc aaa gca ggt ggc 328  
 Pro Ile Gly Leu Tyr Lys Ala Ala Arg His Leu Ile Lys Ala Gly Gly  
 30 35 40

40 aag agg cta agg cct gta ata agc ctc tta gca gtc gaa gcc ctt ggg 376  
 Lys Arg Leu Arg Pro Val Ile Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly  
 45 45 50 55

aaa	gac	tac	aga	aag	att	atc	ccg	gct	gct	gtc	agc	att	gaa	aca	atc	424
Lys	Asp	Tyr	Arg	Lys	Ile	Ile	Pro	Ala	Ala	Ser	Ile	Glu	Thr	Ile		
60						65					70					

45 cac aac ttc acc ctc gtg cat gac gac ata atg gac agg gac gag atg 472  
 His Asn Phe Thr Leu Val His Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met  
 50 75 80 85

agg	agg	gga	gtt	ccg	acg	gta	cac	agg	gtt	tat	ggg	gaa	gct	acg	gcc	520
Arg	Arg	Gly	Val	Pro	Thr	Val	His	Arg	Val	Tyr	Gly	Glut	Ala	Thr	Ala	
90						95				100					105	

55 att tta gca ggc gac aca ctc ttt gct gaa gcc ttc aag ctg ctg aca 568  
 Ile Leu Ala Gly Asp Thr Leu Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr  
 110 115 120

60 aag tgc gat gtt gag agc gag gga atc aga aaa gct aca gaa atg ctt 616  
 Lys Cys Asp Val Glu Ser Glu Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu  
 125 130 135

tcg	gac	gtt	tgc	ata	aaa	ata	tgc	gag	ggg	cag	tac	tac	gac	atg	agc	664
Ser	Asp	Val	Cys	Ile	Lys	Ile	Cys	Glu	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Asp	Met	Ser	
140						145					150					

65 ttt gag aaa aag gag agc gtt tcc gag gag gag tat ctc agg atg gtc 712  
 Phe Glu Lys Lys Glu Ser Val Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val  
 70 155 160 165

gag	ctg	aag	acc	gga	gtg	ctg	att	gca	gct	tct	gca	gca	tta	cct	gcg	760	
Glu	Leu	Lys	Thr	Gly	Val	Leu	Ile	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Leu	Pro	Ala		
170					175					180					185		
5																	
gtg	ctt	ttt	ggg	gag	agc	gag	aat	gta	aag	gcg	ctg	tgg	gac	tac	808		
Val	Leu	Phe	Gly	Glu	Ser	Glu	Glu	Ile	Val	Lys	Ala	Leu	Trp	Asp	Tyr		
					190				195				200				
10																856	
gga	gtt	ctt	agc	ggt	att	ggc	ttc	cag	atc	cag	gac	ctg	ctt	gac			
Gly	Val	Leu	Ser	Gly	Ile	Gly	Phe	Gln	Ile	Gln	Asp	Asp	Leu	Leu	Asp		
					205				210				215				
15																904	
ctg	act	gag	gag	acc	gga	aag	gac	tgg	gga	agc	gac	ctg	ctt	aaa	ggg		
Leu	Thr	Glu	Glu	Thr	Gly	Lys	Asp	Trp	Gly	Ser	Asp	Leu	Leu	Lys	Gly		
					220				225				230				
20																952	
aag	aaa	acc	ctg	att	gtc	ata	aag	gcg	ttc	gaa	aag	gga	gtg	aag	cta		
Lys	Lys	Thr	Leu	Ile	Val	Ile	Lys	Ala	Phe	Glu	Lys	Gly	Val	Lys	Leu		
					235				240				245				
25																1000	
aag	acg	ttt	gga	aag	gaa	aag	gcg	gac	gtc	tct	gag	att	aga	gat	gat		
Lys	Thr	Phe	Gly	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp	Val	Ser	Glu	Ile	Arg	Asp	Asp		
					250				255			260		265			
25																1048	
atc	gaa	aag	tta	aga	gag	tgt	ggt	gcf	att	gat	tac	gct	gcc	agc	atg		
Ile	Glu	Lys	Leu	Arg	Glu	Cys	Gly	Ala	Ile	Asp	Tyr	Ala	Ala	Ser	Met		
					270				275				280				
30																1096	
gca	aga	aag	atg	gct	gaa	gag	gcf	aaa	aga	aag	ctc	gaa	gtt	ctg	cct		
Ala	Arg	Lys	Met	Ala	Glu	Glu	Ala	Lys	Arg	Lys	Leu	Glu	Val	Leu	Pro		
					285				290				295				
35																/ 1144	
gaa	agc	aaa	gcc	aag	gaa	aca	ctg	ctg	gaa	ctt	acc	gac	ttc	ttg	gtt		
Glu	Ser	Lys	Ala	Lys	Glu	Thr	Leu	Leu	Glu	Leu	Thr	Asp	Phe	Leu	Val		
					300				305				310				
40																1199	
aca	aga	aaa	aag	tga	aagcttcaat	tgcatgctct	agatgatcaa	agaattcctg								--	
Thr	Arg	Lys	Lys														
					315												
45																	
<210>	37																
50																	
<211>	317																
<212>	PRT																
<213>	Archaeoglobus fulgidus																
55																	
<400>	37																
60	Met	Val	Lys	Glu	Glu	Ile	Ala	Lys	Arg	Ala	Glu	Ile	Ile	Asn	Lys	Ala	
	1				5				10					15			
65	Ile	Glu	Glu	Leu	Leu	Pro	Glu	Arg	Glu	Pro	Ile	Gly	Leu	Tyr	Lys	Ala	
					20				25				30				
65	Ala	Arg	His	Leu	Ile	Lys	Ala	Gly	Gly	Lys	Arg	Leu	Arg	Pro	Val	Ile	
					35				40				45				

Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly Lys Asp Tyr Arg Lys Ile Ile  
 50 55 60

5 Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile His Asn Phe Thr Leu Val His  
 65 70 75 80

10 Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met Arg Arg Gly Val Pro Thr Val  
 10 85 90 95

15 His Arg Val Tyr Gly Glu Ala Thr Ala Ile Leu Ala Gly Asp Thr Leu  
 100 105 110

20 Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr Lys Cys Asp Val Glu Ser Glu  
 115 120 125

25 Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu Ser Asp Val Cys Ile Lys Ile  
 130 135 140

30 Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser Phe Glu Lys Lys Glu Ser Val  
 145 150 155 160

35 Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val Glu Leu Lys Thr Gly Val Leu  
 165 170 175

40 Ile Ala Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ala Val Leu Phe Gly Glu Ser Glu  
 180 185 190

45 Glu Ile Val Lys Ala Leu Trp Asp Tyr Gly Val Leu Ser Gly Ile Gly  
 195 200 205

50 Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu Leu Asp Leu Thr Glu Glu Thr Gly Lys  
 210 215 220

55 Asp Trp Gly Ser Asp Leu Leu Lys Gly Lys Lys Thr Leu Ile Val Ile  
 225 230 235 240

60 Lys Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Leu Lys Thr Phe Gly Lys Glu Lys  
 245 250 255

65 Ala Asp Val Ser Glu Ile Arg Asp Asp Ile Glu Lys Leu Arg Glu Cys  
 260 265 270

Gly Ala Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Met Ala Arg Lys Met Ala Glu Glu  
 275 280 285

70 Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro Glu Ser Lys Ala Lys Glu Thr  
 290 295 300

75 Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val Thr Arg Lys Lys  
 305 310 315

5 <210> 38  
<211> 35  
5 <212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

10 <220>  
<221> primer\_bind  
15 <222> (1)..(35)  
<223>

20 <400> 38  
gagctttca ttatattcgat tttgatttcg tgacc 35

25 <210> 39  
<211> 38  
30 <212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

35 <220>  
<221> Primer  
40 <222> (1)..(38)  
<223>

45 <400> 39  
aagcttgggtt gatcagaaga agaagaagaa gatgaact 38

50 <210> 40  
<211> 647  
<212> DNA  
55 <213> Arabidopsis thaliana

60 <220>  
<221> Promotor  
<222> (1)..(647)  
65 <223>

70 <400> 40  
gagctttca ttatattcgat tttgatttcg tgaccagcga acgcagaata ctttgttg 60

	taataacttta cccgtgtaaa tcaaaaacaa aaaggcttt gagcttttg tagttgaatt	120
5	tctctggctg atctttctg tacagattca tatatctgca gagacgatat cattgattat	180
	tttagcttot ttgttaactat ttctgttaat ttgggatgag agctctatgt atgtgtgtaa	240
	actttgaaga caacaagaaa ggtaacaagt gagggaggga tgactccatg tcaaaataga	300
10	tgtcataaga gcccatacaa taagtgcctg agcccatcg cttagccagt aactaccaga	360
	tttgtgagatg gatgtgtgaa cagtttttt tttgtatgtag gactgaaatg tgaacaacag	420
15	gogcatgaaa ggctaaatgg gacaatgtat aagcagaaat aacttatcct ctctaacact	480
	tggcctcaca ttgccttcaca cacaatccac acacatccaa tcacaacctc atcatatatc	540
	tcccgctaat cttttttctt ttgtatcttt ttttttgct tattatcttt ttgactttga	600
20	tctcccatca gttcatcttc ttcttctct tctgtatcaac caagctt	647
	<210> 41	
25	<211> 28	
	<212> DNA	
30	<213> Künstliche Sequenz	
	<220>	
35	<221> primer_bind	
	<222> (1)..(28)	
40	<223>	
	<400> 41	28
45	gagctcaactc actgatttcc attgcttg	
	<210> 42	
50	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
55	<220>	
	<221> Primer	
60	<222> (1)..(23)	
	<223>	
65	<400> 42	23
	aagcttttgt tgaagagatt tgg	
70		

<210> 43  
<211> 37  
5 <212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
10 <220>  
<221> primer\_bind  
15 <222> (1)..(37)  
<223>  
  
20 <400> 43  
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37  
  
25 <210> 44  
<211> 34  
30 <212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
35 <220>  
<221> primer\_bind  
40 <222> (1)..(34)  
<223>  
  
45 <400> 44  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac 34  
  
50 <210> 45  
<211> 777  
<212> DNA  
55 <213> Arabidopsis thaliana  
  
60 <220>  
<221> Promotor  
<222> (1)..(777)  
65 <223>  
  
70 <400> 45  
gagctcaactc actgatttcc attgcttcaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt 60

	tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagtttg aaacaacact aactggtcga	120
5	agcaaaaaga aaaaagagtt tcatacatata tctgatttga tggactgtt ggagtttagga	180
	ccaaacatta tctacaaaca aagactttc tcctaacttg tgattccctc ttAAACCCTA	240
	ggggtaatat tctatTTCC aaggatctt agttaaaggc aaATCCGGGA aATTATTGTA	300
10	atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca	360
	tataatatctc tttcttcttta tttcccaaAT taacagacaa aagtagaata ttggctttta	420
15	acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacactttg tttactttag ggtaagtgca	480
	aaaAGCCAAC caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaACGCCGTT aAGTCGATGT	540
	ccgttGattt aaacagtgtc ttgttaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggAAAATTta	600
20	tcacttagtt ttcatcaact tctgaactta ccttcatgg attaggcaat actttccatt	660
	tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctctt ctatTCact	720
	tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaATC tcttcaacaa aaagctt	777
25	<210> 46	
	<211> 804	
30	<212> DNA	
	<213> Synechococcus WH8102	
35	<220>	
	<221> CDS	
40	<222> (1)..(804)	
	<223>	
45	<400> 46	
	atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac	48
	Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His	
50	1 5 10 15	
	cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc	96
	Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala	
	20 25 30	
55	ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc	144
	Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu	
	35 40 45	
60	tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg	192
	Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu	
	50 55 60	
65	ttg att ggc agc ttg att ctg ctc aga gca ttt ctg cac acc ggg ctg	240
	Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu	
	65 70 75 80	
70	tcc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat	288
	Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His	
	85 90 95	

	ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala 100	105	110	336
5	ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac ctg Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu 115	120	125	384
10	gca ccg gag acg ttc cag gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn 130	135	140	432
15	aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met 145	150	155	480
20	cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu 165	170	175	528
25	aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser 180	185	190	576
30	gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr 195	200	205	624
35	tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr 210	215	220	672
40	cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn 225	230	235	720
45	ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe 245	250	255	768
50	cag ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr 260	265		804
55	<210> 47			
60	<211> 267			
65	<212> PRT			
	<213> Synechococcus WH8102			
70	<400> 47			
	Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His 1 5 10 15			
	Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala 20 25 30			
	Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu 35 40 45			

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu  
 50 55 60

5 Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu  
 65 70 75 80

10 Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His  
 85 90 95

15 Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala  
 100 105 110

20 Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu  
 115 120 125

25 Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn  
 130 135 140

30 Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met  
 145 150 155 160

35 Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu  
 165 170 175

40 Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser  
 180 185 190

45 Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr  
 195 200 205

50 Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr  
 210 215 220

55 Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn  
 225 230 235 240

60 Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe  
 245 250 255

65 Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
 260 265

<210> 48

<211> 804

<212> DNA

<213> Künstliche Variante

65

<220>

70 <221> CDS

&lt;222&gt; (1)...(804)

&lt;223&gt;

5

&lt;400&gt; 48

atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac	48
Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His	
1 5 10 15	

cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc	96
Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala	
20 25 30	

ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc	144
Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu	
35 40 45	

tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg	192
Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu	
50 55 60	

ttg att ggc agc ttg att ctg tgg cag acc ttt ctg cac acc ggg ctg	240
Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu His Thr Gly Leu	
65 70 75 80	

ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat	288
Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His	
85 90 95	

ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca	336
Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Val Tyr Ala	
100 105 110	

ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac ctg	384
Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu	
115 120 125	

gca ccg gag acg ttc cag gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac	432
Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn	
130 135 140	

aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg	480
Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met	
145 150 155 160	

cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc	528
Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu	
165 170 175	

aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc	576
Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Phe Ser	
180 185 190	

gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc	624
Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr	
195 200 205	

tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg	672
Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr	
210 215 220	

cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac	720
Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn	
225 230 235 240	

ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt	768
Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe	
245 250 255	

70

804

cag ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga  
 Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
 260 265

5

&lt;210&gt; 49

10 &lt;211&gt; 267

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Variante

15

&lt;400&gt; 49

Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His  
 20 1 5 10 15

Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala  
 20 25 30

25

Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu  
 35 40 45

30

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu  
 50 55 60

35

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu His Thr Gly Leu  
 65 70 75 80

40

Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His  
 85 90 95

45

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala  
 100 105 110

50

Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu  
 115 120 125

55

Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn  
 130 135 140

60

Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met  
 145 150 155 160

65

Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu  
 165 170 175

70

Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser  
 180 185 190

Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr  
 195 200 205

Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr  
 210 215 220

5 Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn  
 225 230 235 240

10 Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe  
 245 250 255

Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
 260 265

15

&lt;210&gt; 50

20 &lt;211&gt; 804

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Variante

25

&lt;220&gt;

30 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(804)

&lt;223&gt;

35

&lt;400&gt; 50

atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac  
 Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His  
 1 5 10 15

48

cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc  
 Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala  
 20 25 30

96

45

ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc  
 Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu  
 35 40 45

144

50

tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg  
 Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu  
 50 55 60

192

55

ttg att ggc agc ttg att ctg ctc aga gca ttt ctg cac acc ggg ctg  
 Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu  
 65 70 75 80

240

60

ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat  
 Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His  
 85 90 95

288

65

ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca  
 Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala  
 100 105 110

336

70

ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac gga  
 Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Gly  
 115 120 125

384

432

His Pro Gly Thr Asp Leu Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn  
 130 135 140

5	aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met 145 150 155 160	480
10	cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu 165 170 175	528
15	aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc Asn Gly Ser Asp Ileu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser 180 185 190	576
20	gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr 195 200 205	624
25	tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr 210 215 220	672
30	cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn 225 230 235 240	720
35	ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe 245 250 255	768
40	cag ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr 260 265	804
45	<210> 51	
50	<211> 267	
	<212> PRT	
	<213> Künstliche Variante	
55	<400> 51	
60	Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His 1 5 10 15	
	Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala 20 25 30	
65	Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu 35 40 45	
70	Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu 50 55 60	
	Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu 65 70 75 80	
	Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His 85 90 95	

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala  
 100 105 110  
 5  
 Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Gly  
 115 120 125  
 10 His Pro Gly Thr Asp Leu Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn  
 130 135 140  
 15 Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met  
 145 150 155 160  
 20 Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu  
 165 170 175  
 25 Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser  
 180 185 190  
 Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr  
 195 200 205  
 30 Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr  
 210 215 220  
 35 Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn  
 225 230 235 240  
 40 Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe  
 245 250 255  
 Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
 260 265  
 45 <210> 52  
 50 <211> 690  
 <212> DNA  
 <213> Nodularia spumigena NSOR10  
 55 <220>  
 <221> CDS  
 60 <222> (1)...(690)  
 <223>  
 65 <400> 52  
 atg gcg atc gcc att att agt ata tgg gct atc agc cta ggt ttg tta  
 Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser Leu Gly Leu Leu  
 70 1 5 10 15 48

	ctt tat att gat ata tcc caa ttc aag ttt tgg atg ttg tta ccg ctc Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Leu 20 25 30	96
5	ata ttt tgg caa aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca gct cat Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His 35 40 45	144
10	gat gcc atg cat ggg gta gtt ttt ccc aaa aat ccc aaa atc aac cat Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro Lys Ile Asn His 50 55 60	192
15	tcc att ggc tca ttg tgc ctg ttt ctt tat ggt ctt tta cct tat caa Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln 65 70 75 80	240
20	aaa ctt tta aaa aag cat tgg cta cat cac cat aat cca gcc agt gaa Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Glu 85 90 95	288
	aca gat cca gat ttt cac aac ggg aag cag aaa aac ttt ttt gct tgg Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn Phe Phe Ala Trp 100 105 110	336
25	tat tta tat ttt atg aag cgt tac tgg agt tgg tta caa att atc aca Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu Gln Ile Ile Thr 115 120 125	384
30	tta atg att att tat aac tta cta aaa tat ata tgg cat ttt cca gag Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp His Phe Pro Glu 130 135 140	432
35	gat aat atg act tat ttt tgg gta gtt ccc tca att tta agt tct tta Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile Leu Ser Ser Leu 145 150 155 160	480
	caa tta ttt tat ttt gga act ttt cta ccc cac agt gag cct gta gaa Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Val Glu 165 170 175	528
40	ggt tat aaa gag cct cat cgt tcc caa act att agc cgt ccc att tgg Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp 180 185 190	576
45	tgg tca ttt ata act tgt tac cat ttt ggt tat cat tac gaa cat cat Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Tyr Glu His His 195 200 205	624
50	gaa tac ccc cat gtt cct tgg tgg caa tta cca gaa att tat aaa atg Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Met 210 215 220	672
55	tct aaa tca aat ttg tga Ser Lys Ser Asn Leu 225	690
60	<210> 53	
	<211> 229	
	<212> PRT	
65	<213> Nodularia spumigena NSOR10	
70	<400> 53	

59

Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15

5 Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Leu  
 20 25 30

10 Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 35 40 45

15 Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro Lys Ile Asn His  
 50 55 60

20 Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln  
 65 70 75 80

25 Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Glu  
 85 90 95

30 Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn Phe Phe Ala Trp  
 100 105 110

35 Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu Gln Ile Ile Thr  
 115 120 125

40 Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp His Phe Pro Glu  
 130 135 140

45 Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile Leu Ser Ser Leu  
 145 150 155 160

50 Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Val Glu  
 165 170 175

55 Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp  
 180 185 190

60 Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Tyr Glu His His  
 195 200 205

65 Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Met  
 210 215 220

70 Ser Lys Ser Asn Leu  
 225

<210> 54

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

5 <220>  
 5 <221> Primer  
 5 <222> (1)..(37)  
 5 <223>  
 10 <400> 54 ggcgcatgcatt ctagaaatga tccagttttaga acaacca 37  
 15 <210> 55  
 15 <211> 37  
 20 <212> DNA  
 20 <213> Künstliche Sequenz  
 25 <220>  
 25 <221> Primer  
 25 <222> (1)..(37)  
 30 <223>  
 35 <400> 55 ggcgcatttc tagactatgg tgctttgttaa atttctg 37  
 40 <210> 56  
 40 <211> 792  
 40 <212> DNA  
 45 <213> Nostoc punctiforme ATCC 29133  
 50 <220>  
 50 <221> CDS  
 50 <222> (5)..(775)  
 55 <223>  
 60 <400> 56 ggcgc atg cat cta gaa atg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa 49  
     Met His Leu Glu Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln  
     1                 5                 10                 15  
 65 gca aaa ctg act cca gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt 97  
   Ala Lys Leu Thr Pro Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu  
   20                 25                 30  
 70 ttc att gct att gtc att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta 145

Phe Ile Ala Ile Val Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu  
 35 40 45

5	tta ctt tcc ctt gac atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct Leu Leu Ser Leu Asp Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro 50 55 60	193
10	gtt ata cta tgg caa aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct Val Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser 65 70 75	241
15	cat gat gcc atg cat ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat His Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn 80 85 90 95	289
20	cat ttg att gga aca ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat His Leu Ile Gly Thr Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr 100 105 110	337
25	caa aaa cta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc Gln Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser 115 120 125	385
30	tca ata gac ccg gat ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct Ser Ile Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala 130 135 140	433
35	tgg tat ttt cat ttt atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att Trp Tyr Phe His Phe Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile 145 150 155	481
40	gcg ttg act att att tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca Ala Leu Thr Ile Ile Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro 160 165 170 175	529
45	agt gat aat cta act tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca Ser Asp Asn Leu Thr Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser 180 185 190	577
50	tta caa tta ttc tat ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata Leu Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile 195 200 205	625
55	ggg ggt tat gtt cag cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att Gly Gly Tyr Val Gln Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile 210 215 220	673
60	tgg tgg tca ttt atc acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat Trp Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His 225 230 235	721
65	cac gaa tat cct cat att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa His Glu Tyr Pro His Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys 240 245 250 255	769
	gca aaa tagtctagag catgcgc Ala Lys	792
	<210> 57	
	<211> 257	
	<212> PRT	
	<213> Nostoc punctiforme ATCC 29133	

&lt;400&gt; 57

5 Met His Leu Glu Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala  
 1 5 10 15

10 Lys Leu Thr Pro Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe  
 20 25 30

15 Ile Ala Ile Val Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu  
 35 40 45

Leu Ser Leu Asp Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val  
 50 55 60

20 Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His  
 65 70 75 80

25 Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His  
 85 90 95

30 Leu Ile Gly Thr Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln  
 100 105 110

35 Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser  
 115 120 125

Ile Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp  
 130 135 140

40 Tyr Phe His Phe Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala  
 145 150 155 160

45 Leu Thr Ile Ile Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser  
 165 170 175

50 Asp Asn Leu Thr Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu  
 180 185 190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly  
 195 200 205

55 Gly Tyr Val Gln Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp  
 210 215 220

60 Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His  
 225 230 235 240

65 Glu Tyr Pro His Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala  
 245 250 255

70 Lys

<210> 58  
5 <211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
10  
  
<220>  
15 <221> Primer  
<222> (1)..(26)  
<223>  
20  
  
<400> 58 26  
25 gtcgaccctg ctttaatgag atatgc  
  
<210> 59  
<211> 27  
30 <212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
35  
  
<220>  
<221> Primer  
40 <222> (1)..(27)  
<223>  
  
45  
  
<400> 59 27  
50 ctcgagcttg gacaatcagt aaattga  
  
<210> 60  
<211> 210  
55 <212> DNA  
<213> Agrobacterium tumefaciens  
  
60  
  
<220>  
<221> Terminator  
65 <222> (1)..(210)  
<223>

5        <400> 60  
5        gtcgaccctg cttaatgag atatgcgaga cgcctatgtat cgcatgatat ttgctttcaa 60  
5        ttctgttgtc cacgttgtaa aaaacctgag catgtgtagc tcagatcctt accgccggtt 120  
5        tcggttcatt ctaatgaata tatacccgta tactatcgta tttttatgaa taatattctc 180  
5        cgttcaattt actgattgtc caagctcgag 210

10      <210> 61

10      <211> 37

15      <212> DNA

15      <213> Künstliche Sequenz

20      <220>

20      <221> Primer

25      <222> (1)..(37)

25      <223>

30      <400> 61  
30      cccgggaattt cttcattttt tcgattttga ttccgtg 37

35      <210> 62

35      <211> 38

40      <212> DNA

40      <213> Künstliche Sequenz

45      <220>

45      <221> Primer

50      <222> (1)..(38)

50      <223>

55      <400> 62  
55      aagcttgggtt gatcagaaga agaagaagaa gatgaact 38

60      <210> 63

60      <211> 652

60      <212> DNA

65      <213> Arabidopsis thaliana

70      <220>

5      <223>  
  
 10     <400> 63  
 cccggaaatt cttcattatt tcgattttga tttcggtacc agcgaacgca gaataccttg      60  
 ttgtgtataa ctttacccgt gtaaatcaa aacaaaaagg cttttgagct ttttttagtt      120  
 15     gaatttctct ggctgatctt ttctgtacag attcatatat ctgcagagac gatatcattt  
 attatggag cttctttga actatccgt gtaatttggg atgagagctc tatgtatgtg      180  
 tgtaaaactt gaagacaaca agaaaggtaa caagtgggg agggatgact ccatgtcaaa      300  
 20     atagatgtca taagaggccc atcaataagt gcttggccc attagctagc ccagtaacta  
 ccagattgtg agatggatgt gtgaacagt tttttttga tgttaggactg aaatgtgaac      360  
 25     aacaggcgca tgaaaggcta aattaggaca atgataagca gaaataactt atccctctcta  
 acacttggcc tcacattgcc cttcacacaa tcccacacaca tccaaatcaca acctcatcat      420  
 atatctcccg ctaatctttt tttctttgat cttttttttt ttgcttattt tttttttgac      480  
 30     tttgatctcc catcagttca tcttcttctt cttcttctga tcaaccaagc tt      540  
 35     <210> 64  
 35     <211> 29  
 35     <212> DNA  
 40     <213> Künstliche Sequenz  
  
 45     <220>  
 45     <221> Primer  
 45     <222> (1)..(29)  
  
 50     <223>  
  
 55     <400> 64  
 gagctcttagc gcaatcttat gtggcacaa      29  
  
 60     <210> 65  
 60     <211> 29  
 60     <212> DNA  
 65     <213> Künstliche Sequenz  
  
 70     <220>  
 70     <221> Primer

```

<222> (1)..(29)
<223>
5
<400> 65
aagctttct tgaaagtaaa gattgagtc 29

10 <210> 66
<211> 1773

15 <212> DNA
<213> Petunia hybrida

20 <220>
<221> Promotor
25 <222> (1)..(1773)
<223>

30 <400> 66
gagctcttagc gcaatcttat gtggtacaaa tcttgattag tcggaaaaaa atgatgtggc 60
cctacaaatg gttggaggat gggagattg gctctatcta gagttatgtg gttgttgaag ✓ 120
35 catttggta ctctctgctg tggtagttgg catatccaca ttgtctcctt ccactttat 180
gacaattacg tgaaagttat gggttttttt gtctatTTT gtcgaggcct ttctttcct 240
40 tccaggttgt tgaagatggc ccaattcgat tagaataatg tttttagctt tagcatattc 300
tctctcgTTT acacgattat agtaataatg atataggatg acagaagttg acacataaat 360
45 tttttattct ctccatttac tttaatccaa atctcaccta ccctaaacctt tttaatatg 420
tattcaatag tctatccgag taaattgtaa atttaacaac cattgataat attgacacct 480
actaacatAT actagtaaAG agaatattAA catggcacat ataatttgat gcaaaatgag 540
50 tatgatgaaa tttaaaccCA aaatctcttg attttgacag tgcacccTTG acttggtaac 600
taataagtca tggTTtagtg gcagaaAGAC aaactcatCC accaactgta tagcaataaa 660
55 aaatagaaga atcttcctGA ggcaaAGTT tggAAAATT aagagtggCT gagatttaat 720
ttcaacagga attagttcca cttaactttt aggttacgat acagtgcTA ttAAATAACT 780
taattgtatt agatatttct tgcacccAA aaattttAAA actgAAAAAA ggttagcaatC 840
60 aaaataaACA aaaggacAAA ataagtGAAA ggtacagCCA ccaaccCTGG cggctcactG 900
tttgggtt AAAACGTAGA ctTACACCTA CAAACATCTA CAACCTAAAT gaggcaataa 960
65 tactttGCCc AAAATTACCA agAAAAGAAA aagAAAAGGAA tccCTTAATA ttactctcct 1020
ccatttcaca ataaatatCC tagTTTGACT taaatttagAG tttaaaaaAT gaaAGACGAC 1080
ttttaaaaACT tgtaatCTAA aataaatCAT agttAAATGT gtggCTATAA atcattgtat 1140
70 taacCGTAAA gtggtaAGTT taaaAGTTAA ttgtttCAA atataAAATT gtactatCAT 1200

```

	tcttttgga atggactaat aagaaaacta tgacatccat tatggagcgg agggagtatc	1260
5	tcctttaac aataaccttt gtccttcaa ttcaattatc agtatgcaaa cattaaaaat	1320
	tattattgtat gttaagtacc acatcatcct taatgataga atcatcgtag aacgctttc	1380
	caggcacaca ttcaaactag ttagaccagt accacacatc gaatattcca gacttcttg	1440
10	tttgaatagt cgactacatt ggataatgga acttctcgaa ttaacttcga attagtcgag	1500
	cccaaataaa tatatacgta gggggaaaa ctataaaatg tttgacaaaa atgtcaaatt	1560
15	aatatatcaa tctgcaacaa cttttcacc ttgagaacac agctgaaatt ttttacaaag	1620
	gtagttggtg aagctagtca gcgaatccca ttaccccca ctctacctaa ccccttcac	1680
	caacaacaaa ttctgtat ttaaaaacta gccaaaaaag aactctctt tacaaagagc	1740
20	caaagactca atcttactt tcaagaaaaag ctt	1773

<210> 67

25 <211> 39

<212> DNA

30 <213> Künstliche Sequenz

<220>

35 <221> Primer

<222> (1) .. (39)

40 <223>

<400> 67

45	gcgcatgcac ctagaaatga atttttgtga taaaccagt	39
----	--	----

<210> 68

50 <211> 37

<212> DNA

55 <213> Künstliche Sequenz

<220>

60 <221> Primer

<222> (1) .. (37)

65 <223>

<400> 68

	gcgcatgctc tagattacga attggttact gaattgt	37
--	--	----

<210> 69  
 <211> 819  
 5 <212> DNA  
 <213> Nostoc punctiforme ATCC 29133

10 <220>  
 <221> CDS  
 15 <222> (5)..(802)  
 <223>

20 <400> 69  
 gcgc atg cat cta gaa atg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat 49  
 Met His Leu Glu Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr  
 1 5 10 15

25 gtt gca ata gag caa tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg 97  
 Val Ala Ile Glu Gln Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu  
 20 25 30

30 gtg att gtc ata gta att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt 145  
 Val Ile Val Ile Val Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe  
 35 40 45

35 tta cta gct att aat tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att 193  
 Leu Ala Ile Asn Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile  
 50 55 60

40 gca ata gtt tgg caa atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca 241  
 Ala Ile Val Trp Gln Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala  
 65 70 75

45 cat gat gct atg cat ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat 289  
 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn  
 80 85 90 95

50 aat ttt atc ggt tca cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat 337  
 Asn Phe Ile Gly Ser Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr  
 100 105 110

55 caa cag atg tta aag aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc 385  
 Gln Gln Met Leu Lys Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser  
 115 120 125

60 tgg tat ctc cat ttc atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata 481  
 Trp Tyr Leu His Phe Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile  
 145 150 155

65 gta cta act atc cta ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat 529  
 Val Leu Thr Ile Leu Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His  
 160 165 170 175

70 caa ata aat ctc atc tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc 577  
 Gln Ile Asn Leu Ile Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser  
 180 185 190

70 att caa ctg ttt tat ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag 625

## 69

	Ile Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys	
	195 200 205	
5	aaa gga tat gtt tat ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act	673
	Lys Gly Tyr Val Tyr Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr	
	210 215 220	
10	ttt ttg tca ttt atc gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat	721
	Phe Leu Ser Phe Ile Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His	
	225 230 235	
15	cat gag tat ccc cat gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag	769
	His Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys	
	240 245 250 255	
	cag aga gta ttc aac aat tca gta acc aat tcg taatcttagag catgcgc	819
	Gln Arg Val Phe Asn Asn Ser Val Thr Asn Ser	
	260 265	
20	<210> 70	
	<211> 266	
25	<212> PRT	
	<213> Nostoc punctiforme ATCC 29133	
30	<400> 70	
	Met His Leu Glu Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val	
35	1 5 10 15	
	Ala Ile Glu Gln Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val	
	20 25 30	
40	Ile Val Ile Val Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu	
	35 40 45	
45	Leu Ala Ile Asn Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala	
	50 55 60	
50	Ile Val Trp Gln Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His	
	65 70 75 80	
	Asp Ala Met His Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn	
55	85 90 95	
	Phe Ile Gly Ser Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln	
	100 105 110	
60	Gln Met Leu Lys Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu	
	115 120 125	
65	Val Asp Pro Asp Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp	
	130 135 140	
70	Tyr Leu His Phe Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val	
	145 150 155 160	

Leu Thr Ile Leu Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln  
 165 170 175

5 Ile Asn Leu Ile Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile  
 180 185 190

10 Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys  
 195 200 205

15 Gly Tyr Val Tyr Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe  
 210 215 220

20 Leu Ser Phe Ile Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His  
 225 230 235 240

25 Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln  
 245 250 255

30 Arg Val Phe Asn Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260 265

35 <210> 71

35 <211> 33

35 <212> DNA

35 <213> Künstliche Sequenz

40 <220>

45 <221> Primer

45 <222> (1)...(33)

45 <223>

50 <400> 71  
 50 gcgcatgcat ctagaaatgg cgatcgccat tat 33

55 <210> 72

55 <211> 32

60 <212> DNA

60 <213> Künstliche Sequenz

65 <220>

65 <221> Primer

&lt;222&gt; (1)..(32)

&lt;223&gt;

5

<400> 72  
gcgcatgctc tagatcacaa atttgattta ga

32

10

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 720

15 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Nodularia spumigena NSOR10

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

25 &lt;222&gt; (5)..(703)

&lt;223&gt;

30

&lt;400&gt; 73

gcgc atg cat cta gaa atg gcg atc gcc att att agt ata tgg gct atc  
Met His Leu Glu Met Ala Ile Ala Ile Ser Ile Trp Ala Ile  
1 5 10 15

49

35

agc cta ggt ttg tta ctt tat att gat ata tcc caa ttc aag ttt tgg  
Ser Leu Gly Leu Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp  
20 25 30

97

40

atg ttg tta ccg ctc ata ttt tgg caa aca ttt tta tat acg gga tta  
Met Leu Leu Pro Leu Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu  
35 40 45

145

45

ttt att aca gct cat gat gcc atg cat ggg gta gtt ttt ccc aaa aat  
Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn  
50 55 60

193

50

ccc aaa atc aac cat ttc att ggc tca ttg tgc ctg ttt ctt tat ggt  
Pro Lys Ile Asn His Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly  
65 70 75

241

55

ctt tta cct tat caa aaa ctt tta aaa aag cat tgg cta cat cac cat  
Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His  
80 85 90 95

289

60

aat cca gcc agt gaa aca gat cca gat ttt cac aac ggg aag cag aaa  
Asn Pro Ala Ser Glu Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys  
100 105 110

337

65

aac ttt ttt gct tgg tat tta tat ttt atg aag cgt tac tgg agt tgg  
Asn Phe Phe Ala Trp Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp  
115 120 125

385

65

tta caa att atc aca tta atg att att tat aac tta cta aaa tat ata  
Leu Gln Ile Ile Thr Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile  
130 135 140

433

70

tgg cat ttt cca gag gat aat atg act tat ttt tgg gta gtt ccc tca  
Trp His Phe Pro Glu Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser  
145 150 155

481

	att tta agt tct tta caa tta ttt tat ttt gga act ttt cta ccc cac	529
5	Ile Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His 160 165 170 175	
	agt gag cct gta gaa ggt tat aaa gag cct cat cgt tcc caa act att	577
	Ser Glu Pro Val Glu Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile 180 185 190	
10	agc cgt ccc att tgg tgg tca ttt ata act tgt tac cat ttt ggt tat	625
	Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr 195 200 205	
15	cat tac gaa cat cat gaa tac ccc cat gtt cct tgg tgg caa tta cca	673
	His Tyr Glu His His Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro 210 215 220	
20	gaa att tat aaa atg tct aaa tca aat ttg tgatcttagag catgcgc	720
	Glu Ile Tyr Lys Met Ser Lys Ser Asn Leu 225 230	
	<210> 74	
25	<211> 233	
	<212> PRT	
30	<213> Nodularia spumigena NSOR10	
	<400> 74	
35	Met His Leu Glu Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser 1 5 10 15	
40	Leu Gly Leu Leu Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met 20 25 30	
45	Leu Leu Pro Leu Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe 35 40 45	
	Ile Thr Ala His Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro 50 55 60	
50	Lys Ile Asn His Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu 65 70 75 80	
55	Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Asn 85 90 95	
60	Pro Ala Ser Glu Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn 100 105 110	
65	Phe Phe Ala Trp Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu 115 120 125	
	Gln Ile Ile Thr Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp 130 135 140	

His Phe Pro Glu Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile  
145 150 155 160

5 Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser  
165 170 175

10 Glu Pro Val Glu Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser  
180 185 190

15 Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His  
195 200 205

Tyr Glu His His Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu  
210 215 220

20 Ile Tyr Lys Met Ser Lys Ser Asn Leu  
225 230

25

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**